



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Caracterização polifásica de agentes
fúngicos biodeteriogénicos de bens
patrimoniais**

Margarida Isabel Martins Pires

Orientação: Prof.^a Doutora Ana Teresa Caldeira

Prof.^a Doutora Maria do Rosário Martins

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Caracterização polifásica de agentes
fúngicos biodeteriogénicos de bens
patrimoniais**

Margarida Isabel Martins Pires

Orientação: Prof.^a Doutora Ana Teresa Caldeira

Prof.^a Doutora Maria do Rosário Martins

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2016

“Se tiver de suportar duas ou três lagartas, para chegar a conhecer as borboletas, não
faz mal.”

Antoine de Saint-Exupéry, em “O Príncipezinho”

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma possibilitaram, contribuíram e/ou estiveram presentes na realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, quero agradecer às minhas orientadoras, a Prof^a. Doutora Ana Teresa Cadeira e a Prof^a. Doutora Maria do Rosário Martins, pela disponibilidade, simpatia e compreensão, pelos conselhos dados ao longo do trabalho e por tudo o que me ensinaram.

A todos os colegas de laboratório, Mara Silva, Marina Pérez, Ricardo Vieira, Patrícia Nunes, Patrícia Freitas, Ana Branco, Margarida Nunes, Cátia Salvador, Ana Fialho, Sílvia Arantes, Carla Nogueira, Filipa Lopes, Miguel Santos, pelo companheirismo, apoio e energia positiva, que tornaram o trabalho laboratorial muito mais agradável. Quero fazer um agradecimento especial à Tânia Rosado, que acompanhou todo o meu trabalho e que se mostrou sempre disponível para me ajudar e me ensinar.

Às técnicas de laboratório da Fase III-CLAV da Universidade de Évora, D. Lena, D. Esperança, D. Jesuína e Anabela pelo apoio, atenção e carinho que sempre demonstraram no decorrer do trabalho.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e pela compreensão.

À minha mãe e ao meu irmão, que possibilitaram o meu ingresso no mundo académico e que sempre manifestaram o seu apoio, mesmo nas fases mais difíceis. Agradeço a sua compreensão, entusiasmo e carinho.

Ao André, que esteve sempre presente, que me aturou nos dias maus e que me felicitou nos dias bons. Que nunca deixou de me motivar e de me pedir para dar o meu melhor. Obrigada pela força e pelo amor.

À Universidade de Évora e ao Laboratório HERCULES, por me permitirem realizar este trabalho, fornecendo as instalações, equipamentos, reagentes e materiais necessários.

Caracterização polifásica de agentes fúngicos biodeteriogénicos de bens patrimoniais

Resumo

Os bens patrimoniais estão constantemente expostos a diversos fenómenos de alteração, provocados por variados fatores, incluindo, a contaminação microbiológica. Assim, a identificação e caracterização dos microrganismos colonizadores é fundamental na prevenção e/ou remediação da biodegradação.

Neste trabalho, procedeu-se à caracterização de isolados fúngicos, responsáveis por processos de biodeterioração de diversos bens patrimoniais, utilizando uma metodologia polifásica que envolveu métodos moleculares, tais como PCR *fingerprinting* e sequenciação de DNA, métodos espectrais, como μ -FTIR e μ -RAMAN, e métodos de microanálise, tais como MEV-EDS e microscopia ótica.

Os resultados obtidos possibilitaram uma identificação prévia dos isolados fúngicos baseada nas características morfológicas; o *fingerprinting* espectral permitiu a distinção entre diferentes géneros; e a análise filogenética e polimórfica possibilitou a identificação prévia e caracterização das estirpes em estudo.

A abordagem polifásica provou ser uma ferramenta útil para deteção e caracterização de fungos biodeteriogénicos, que pode ser um importante contributo para a preservação do Património Cultural.

Abstract

Polyphasic Characterization of biodeteriogenic fungi present on cultural heritage assets

Abstract

Cultural Heritage is continuously exposed to countless alterations, caused by several factors, including microbiological contamination. Thus, the identification and characterization of colonizing microorganisms is crucial for the prevention and/or remediation of biodegradation.

In this work, a characterization of fungal isolates responsible for biodeterioration processes of various cultural assets was performed, using a polyphasic approach that includes molecular methods, such as PCR fingerprinting and DNA sequencing, spectral methods, such as μ -FTIR and μ -Raman, and microanalysis methods, such as SEM-EDX and optical microscopy.

The results enabled early identification of fungal isolates based on morphological characteristics; spectral fingerprinting allowed the distinction between different genera; and phylogenetic and polymorphic analysis enabled the identification and characterization of the studied strains.

The polyphasic approach has proven to be an useful tool for detection and characterization of biodeteriogenic fungi, which can be an important contribution for the preservation of Cultural Heritage.

Índice

1.	Nota Prévia	1
2.	Revisão Bibliográfica.....	5
2.1.	A Herança Cultural	7
2.2.	Os fungos como agentes biodeteriogénicos	11
2.3.	Materiais <i>versus</i> Bens Culturais	15
2.3.1.	Madeira/Talha Dourada	15
2.3.2.	Pedra	18
2.3.3.	Pintura Mural	21
2.3.4.	Papel/Pergaminho	23
2.3.5.	Marfim.....	26
2.4.	Biodegradação: estratégia para uma abordagem polifásica	27
2.4.1.	Métodos Clássicos dependentes de Cultura.....	27
2.4.2.	Métodos Moleculares	28
2.4.3.	Métodos Espectrais.....	31
2.4.4.	Outros métodos para avaliação da colonização microbiana	32
3.	Metodologia	37
3.1.	Manutenção de culturas fúngicas	39
3.2.	Caracterização morfológica	40
3.3.	Caracterização espectral dos isolados fúngicos	41
3.3.1.	Análise por espectroscopia Raman	41
3.3.2.	Análise por espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier com reflexão total acumulada (FTIR-ATR)	42
3.3.3.	Análise por Microscopia Eletrónica de Varrimento	42
3.4.	Caracterização molecular dos isolados fúngicos	43
3.4.1.	Extração de DNA de fungos filamentosos	43
3.4.2.	Extração de DNA de leveduras	44
3.4.3.	Quantificação de DNA	44
3.4.4.	Amplificação de DNA	45
4.	Resultados e Discussão	51
4.1.	Locais de recolha dos isolados fúngicos	53
4.2.	Caracterização Morfológica	59
4.3.	Caracterização Espectral	88
4.3.1.	FTIR	88

Índice

4.3.2.	Espectroscopia Raman.....	95
4.4.	Caracterização Molecular	96
4.4.1.	RAPD-PCR	96
4.4.2.	Amplificação e sequenciação de regiões ITS	103
4.4.3.	β -tubulina	105
5.	Considerações Finais	109
6.	Referências Bibliográficas.....	113
7.	Anexos	121
A.	Materiais	123
B.	Equipamentos	123
C.	Composição dos meios de cultura.....	124
D.	Soluções para extração de DNA de fungos filamentosos.....	124
E.	Gel de agarose 1%	125
F.	Análise elementar por MEV-EDS.....	125
G.	Resumo das características dos isolados fúngicos observadas macroscopicamente	126
H.	Quantificação de DNA.....	142

Índice de Figuras

Figura 1 - Exemplos de obras de arte. A- Pietá, de Michelangelo; B - O Nascimento de Vénus, Botticelli; C - Página do "Codex Atlanticus", de Leonardo da Vinci; D - Talha dourada da Igreja de São Francisco, Porto.....	7
Figura 2 - Obras de arte afetadas por biodeterioração/biodegradação. A - Pintura a pastel com contaminação fúngica devido ao acondicionamento em película de plástico. B - Bolor em vestes provenientes da Áustria. C - Molduras históricas em folha de ouro contaminadas por fungos. D – Camada densa de Trichoderma sp. num livro histórico. (Adaptado de Sterflinger et al., 2010).....	8
Figura 3 - Amostragem. A - Convento de Nossa Senhora da Saudação, Montemor-o-Novo. B - Convento de Cristo, Tomar	10
Figura 4 - Biofilmes presentes em Angkor Thom, Cambodja. (Adaptado de Hu et al., 2013)	12
Figura 5 - Exemplos de obras de arte em madeira. A - Coche; B - Retábulo em talha dourada; C - Escultura.....	15
Figura 6 - A e B - estrutura celular de uma angiospérmica; C e D - Estrutura celular de uma gimnospérmica; E - Constituição do Xilema. (Adaptado de Blanchette, 2000) ..	16
Figura 7 - Contaminação microbiológica em madeira: A – Árvore; B – Estátua egípcia (adaptado de Blanchette, 2000); C – Cerca do museu Open-Air (adaptado de Irbe et al., 2012)	16
Figura 8 - Efeitos da bioterioração/biodegradação em edifícios edificadas em pedra. A - Convento de Cristo, Tomar. B - Palácio da Pena, Sintra (Adaptado de Macedo, 2009)	19
Figura 9 - Danos comuns provocados pela biodeterioração/biodegradação das pinturas murais. A - Alterações cromáticas; B - Fissuras.....	23
Figura 10 - Danos comuns em documentos escritos e iconográficos. A e B - manchas e desfragmentação do papel. (Adaptado de Michaelson, 2009)	24
Figura 11 - Exemplo de uma peça de marfim. (Adaptado de Pinzari, 2013).....	26
Figura 12 - Representação esquemática das metodologias utilizadas na realização deste trabalho.....	35
Figura 13 - Representação de um isolado fúngico	40
Figura 14 - Microscópio Ótico (Motic BA410E).....	41
Figura 15 - Espectrómetro Raman (HORIBA Xplora Raman).....	41
Figura 16 – Espectrómetro de infravermelhos com transformada de Fourier (Bruker ALPHA) com reflexão total acumulada.	42
Figura 17 - Microscópio Eletrónico de Varrimento (Hitachi S-3700N) com espectrómetro de raios-X acoplado.	43
Figura 18 - Termociclador para realização de Reações de Polimerização em Cadeia	46
Figura 19 - Termociclador e placa utilizados para a reação de PCR em Tempo Real.	49
Figura 20 – Isolados fúngicos provenientes das pinturas murais das Casas Pintadas, Évora.....	53
Figura 21 - Isolados fúngicos provenientes das pinturas murais da Igreja de Santa Clara, Arraiolos.....	54
Figura 22 - Isolados fúngicos provenientes da Igreja de Santo Aleixo, Montemor-o-Novo.....	55
Figura 23 - Isolados fúngicos provenientes das pinturas murais do Convento de Nossa Senhora da Saudação, Montemor-o-Novo.....	56

Índice

Figura 24 - Isolados fúngicos provenientes de peças de marfim.....	56
Figura 25 - Isolados fúngicos provenientes de umas das paredes de pedra da Sé Catedral de Évora.....	57
Figura 26 - Isolados fúngicos provenientes da talha dourada da Igreja do Colégio do Espírito Santo, Évora.....	58
Figura 27 - Isolados fúngicos provenientes de documentos pertencentes ao espólio da Torre do Tombo: Foral de Alvito (A) e Livro da Inquisição de Lisboa (B).	58
Figura 28 - Espectro de FTIR do meio de cultura MEA.	89
Figura 29 – Espectros de FTIR dos isolados fúngicos do género <i>Aspergillus</i> : Z4F4 (azul) e P2-3 (vermelho).	89
Figura 30 - Espectros de FTIR dos isolados fúngicos do género <i>Fusarium</i> : NEF29 (azul) e SEF7 (vermelho).....	90
Figura 31 - Espectro de FTIR do isolado fúngico do género <i>Mucor</i> : Altar 2-E.	90
Figura 32 - Espectro de FTIR do isolado fúngico do género <i>Rhodotorula</i> : CPIL1.	91
Figura 33 - Espectros de FTIR dos isolados fúngicos leveduriformes: Z1LA e Z1LB. .	91
Figura 34 - Espectros de FTIR dos isolados fúngicos do género <i>Penicillium</i> : P3A4F1 (A), P5F2 (B), Z9-F1 (C), Z11-F2 (D), Z14-F1 (E), NEF27 (F), P5-3 Preto A (G), Altar 2-Coluna B (H), Altar 2-Coluna F (I) e Altar 2-K (J).....	92
Figura 35 - Espectros de FTIR dos isolados fúngicos do género <i>Cladosporium</i> : Z4F2 (A), Z6-F2 (B), SA-5B (C), SA-5E (D), NEF11 (E), P2-1 (F), P4-5 Verde (G), Altar 2-Coluna C (H), Altar 2-D (I), Altar 2-I (J), FA5a (K) e FA7b (L).	93
Figura 36 - Espectro de FTIR de alguns dos isolados fúngicos cujas características não permitiram uma identificação prévia: P1A3F1 (A), Z15-F1b (B), SA-3F (C), CRIF2 (D), P2-2A (E), FA7a (F) e IL12a (G).	94
Figura 37 - Espectro de Raman do meio de cultura MEA	95
Figura 38 – Espectros de Raman dos isolados fúngicos Z1LA (A), P1A4F1 (B), NEF29 (C) e IL10b (D).	96
Figura 39 - Gel de eletroforese (A) e dendograma (B) de RAPD-PCR: 1 e 20 – Marcador DNA 100 bp; 2 – Branco; 3 – FA5a; 4 – FA5b; 5 – FA6a; 6 – FA6b; 7 – FA6c; 8 – FA7a; 9 – FA7b; 10 – IL9c; 11 – IL10b; 12 – IL12a; 13 – Z15-F1b; 14 – Z6-F2; 15 – Z9-F1; 16 – Z11-F2; 17 – Z14-F1; 18 – CPIL1; CRIF2.....	97
Figura 40 - Gel de eletroforese (A) e dendograma (B) de RAPD-PCR: 1e 20 – Marcador DNA 100 bp; 2 – Branco; 3 – NEF11; 4 – NEF27; 5 – NEF29; 6 – SEF7; 7 – SEF21; 8 – P3A4F1; 9 – P5F2; 10 – P1A3F1; 11 – P1A4F1; 12 - Altar 2-Coluna B; 13 – Altar 2-Coluna C; 14 – Altar 2-Coluna F; 15 – Altar 2-D; 16 – Altar 2-E; 17 – Altar 2-I; 18 – Altar 2-K; 19 – Z1LA.	99
Figura 41 - Gel de eletroforese (A) e dendograma (B) de RAPD-PCR: 1e 17 – Marcador DNA 100 bp; 2 – Branco; 3 – Z1LB; 4 – Z4F2; 5 – Z4F4; 6 – SA-3C; 7 – SA-3F; 8 – SA-5B; 9 – SA-5E; 10 – P2-1; 11 – P2-2A; 12 – P2-3; 13 – P4-5 verde; 14 – P5-2A Ad. Org. A; 15 – P5-2A Ad. Org. B; 16 – P5-3 Preto A.....	101
Figura 42 - Géis de eletroforese de ITS: (A) 1 - marcador DNA 100 bp; 2 - FA5a; 3 – FA5b; 4 – FA6a; 5 – FA6b; 6 – FA6c; 7 – FA7a; 8 – FA7b; 9 – IL9c; 10 – IL10b; 11 – IL12a; 12 – Z15-F1b; 13 – Z6-F2; 14 – Z9-F1; 15 – Z11-F2. (B) 1 – marcador DNA 100 bp; 2 – Z14-F1; 3 – CPIL1; 4 – CRIF2; 5 – NEF11; 6 – NEF27; 7 – NEF29; 8 – SEF7; 9 – SEF21; 10 – P3A4F1; 11 – P5F2; 12 – P1A3F1; 13 - P1A4F1; 14 – Altar 2-Coluna B; 15 – Altar 2-Coluna C; 16 – Altar 2-Coluna F; 17 – Altar 2-D; 18 – Altar 2-E; 19 – Altar 2-I; 20 – Altar 2-K. (C) 1 – marcador DNA 100 bp; 2 – Z1LA; 3 – Z1LB; 4 – Z4F2; 5 – Z4F4; 6 – SA-3C; 7 – SA-3F; 8 – SA-5B; 9 – SA-5B; 10 – P2-1; 11 – P2-	

Índice

2A; 12 – P2-3; 13 – P4-5 Verde; 14 – P5-2A Ad. Org. A; 15 - P5-2A Ad. Org. B; 16 – P5-3 Preto A.....	103
Figura 43 - Géis de eletroforese de β -tubulina: (A) 1 e 20 – Marcador DNA 100 bp; 2 e 3 – Branco; 4 – FA5a; 5 – FA5b; 6 – FA6a; 7 – FA6b; 8 – FA6c; 9 – FA7a; 10 – FA7b; 11 – IL9c; 12 – IL10b; 13 – IL12a; 14 – Z15-F1b; 15 – Z6-F2; 16 – Z9-F1; 17 – Z11-F2; 18 – Z14-F1; 19 – CPIL1. (B) 1 e 20 – Marcador DNA 100 bp; 2 – Branco; 3 – CRIF2; 4 – NEF11; 5 – NEF27; 6 – NEF29; 7 – SEF7; 8 – SEF21; 9 – P3A4F1; 10 – P5F2; 11 – P1A3F1; 12 – P1A4F1; 13 – Altar 2-Coluna B; 14 – Altar 2-Coluna C; 15 – Altar 2-Coluna F; 16 – Altar 2-D; 17 – Altar 2-E; 18 – Altar 2-I; 19 – Altar 2-K. (C) 1 e 18 – Marcador 100 bp; 2 – Branco; 3 – Z1LA; 4 – Z1LB; 5 – Z4F2; 6 – Z4F4; 7 – SA-3C; 8 – SA-3F; 9 – SA-5B; 10 – SA-5E; 11 – P2-1; 12 – P2-2A; 13 – P2-3; 14 – P4-5 verde; 15 – P5-2A Ad. Org. A; 16 – P5-2A Ad. Org. B; 17 – P5-3 Preto A.	106
Figura 44 - Quantificação da β -tubulina em diferentes isolados fúngicos. A quantificação efetuou-se utilizando os valores de Ct das diferentes amostras numa curva de calibração com diluições decimais seriadas de <i>Cladosporium halotolerans</i> (SA-5B). As barras de erro correspondem aos valores do desvio padrão para n=2.	107
Figura 45 - Imagem de MEV-EDS, onde é possível observar a composição elementar do isolado fúngico, cujos constituintes identificados são carbono e oxigénio.	125
Figura 46 – Espectro de EDS com a composição elementar de um isolado fúngico.	125

Índice

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Primers utilizados nas várias reações de amplificação.....	45
Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos).....	60
Tabela 3 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais das Casas Pintadas, Évora (incubação de 7 dias para os fungos filamentosos e 3 dias para as leveduras).	74
Tabela 4 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em peças de marfim (incubação de 7 dias).....	75
Tabela 5 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais da Igreja de Santa Clara, Arraiolos (incubação de 7 dias).....	76
Tabela 6 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais da Igreja de Santo Aleixo, Montemor-o-Novo (incubação de 7 dias).	78
Tabela 7 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais de uma parede de pedra da Sé de Évora (incubação de 7 dias para os fungos filamentosos e 3 dias para as leveduras).	79
Tabela 8 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais do Convento de Nossa Senhora da Saudação, Montemor-o-Novo (incubação de 7 dias).....	81
Tabela 9 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em talha dourada existente na Igreja do Colégio do Espírito Santo, Évora (incubação de 7 dias).	83
Tabela 10 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em documentos de papel e pergaminho do espólio da Torre do Tombo (incubação de 7 dias).	85
Tabela 11 – Fragmentos amplificados por M13-PCR nos microrganismos apresentados na figura 39.	98
Tabela 12 - Fragmentos amplificados por M13-PCR nos microrganismos apresentados na figura 40.	100
Tabela 13 - Fragmentos amplificados por M13-PCR nos microrganismos apresentados na figura 41.	102
Tabela 14 - Comparação entre a identificação baseada nas características morfológicas e a sequenciação.	104
Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. .	126
Tabela 16 - Quantificação do DNA dos isolados fúngicos.	142

Abreviaturas e Unidades

Abreviaturas

Abs – Absorvância

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*

EDTA – Ácido etilenodiamina tetraacético, do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*

FISH – Hibridação *in situ* fluorescente

FTIR – Espectroscopia de Infravermelhos com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

ITS – *Internal Transcribed Spacer*

MALDI-TOF – do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-Of-Flight*

MEV-EDS – Microscopia Eletrônica de Varrimento acoplada a espectrometria de Energia Dispersiva de raios-X (do inglês, *Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-ray spectroscopy*)

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

RAPD-PCR – do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA - PCR*

RNA – Ácido Ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*

rRNA – Ácido Ribonucleico ribossomal, do inglês *ribosomal ribonucleic acid*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TE – Tampão de eluição

ufc – Unidades Formadoras de Colônias

Unidades de medida e Convenções

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

°C – graus Celsius

cm³ – centímetros cúbicos

g – grama

h – hora

M – molar

mg – miligrama

mL - mililitro

mM - milimolar

nm – nanômetro

pg - picograma

rpm – rotações por minuto

1. Nota Prévia



Durante várias décadas, o papel dos microrganismos na degradação do Património Cultural foi negligenciado, valorizando-se sobretudo o efeito dos fatores ambientais e químicos, razão pela qual muitos trabalhos de conservação e restauro nem sempre se revelaram eficazes ao longo do tempo, podendo tornar-se até prejudiciais, por potenciarem o desenvolvimento de microrganismos. Estudos mais recentes têm incidido sobre a avaliação desta ação biodeteriogénica nos mais variados bens patrimoniais, como por exemplo, exemplares elaborados em papel [1-3], estudos em obras de arte produzidas com madeira [4, 5], e estudos em pinturas murais [6-8], revelando que os microrganismos possuem um papel determinante nos fenómenos de alteração. O ataque microbiológico leva a perdas de valor inestimável no que respeita à Herança Cultural da Humanidade, e, de modo a minimizá-lo, é necessário, em primeira instância, identificar quais os microrganismos intervenientes.

A identificação dos agentes efetivamente biodeteriogénicos é por vezes muito difícil, devido à inexistência de uma sistematização nos processos utilizados, à inexistência de *kits* de identificação rápida com testes específicos para este tipo de materiais (como existem já para outras áreas, entre as quais, a microbiologia médica) e ainda devido a algum desconhecimento dos conservadores/restauradores em relação à área da Microbiologia. Todos estes fatores vão impedir uma intervenção rápida, prolongando o contacto dos microrganismos com os artefactos e, consequentemente, os seus danos.

De modo a colmatar esta falha, abordagens expeditas para identificação de microrganismos devem ser implementadas, bem como a criação de bases de dados que combinem os vários agentes biodeteriogénicos de bens patrimoniais, com os materiais e locais de isolamento e com diferentes marcadores de identificação destes agentes, contribuindo assim para o desenvolvimento de ferramentas úteis, que permitam respostas efetivas na preservação da Herança Cultural.

Objetivos

Objetivo Principal

Este trabalho tem como objetivo principal a identificação de agentes fúngicos biodeteriogénicos, provenientes de diversos bens patrimoniais com evidentes sinais de alteração, como pintura mural, monumentos edificados em pedra, talha dourada, papel e marfim, através de uma abordagem polifásica, baseada na análise morfológica, espectral e molecular.

Objetivos Específicos

- Identificar os agentes fúngicos biodeteriogénicos através de uma abordagem polifásica, que integra:
 - Observação da morfologia dos isolados fúngicos a nível macro e microscópico, em meios de cultura diferentes, com recurso a microscopia ótica e a microscopia eletrónica;
 - Caracterização molecular por amplificação de regiões específicas de DNA, como a região ITS e os genes que codificam para β -tubulina e estabelecer das relações filogenéticas, por análise das sequências destas regiões, bem como avaliar o perfil de polimorfismo, por RAPD-PCR;
 - Análise espectral das colónias fúngicas através de μ -FTIR e μ -Raman.
- Integrar a informação recolhida através das várias técnicas, de modo a perceber quais são mais adequadas para a discriminação dos microrganismos contaminantes dos bens patrimoniais;
- Compreender a relação entre o tipo de colonizadores, os géneros fúngicos predominantes e os diferentes materiais;
- Contribuir com informação para a criação de uma futura base de dados, de forma a promover a rápida identificação de diversas comunidades fúngicas presentes nos bens patrimoniais.

2. Revisão Bibliográfica



2.1. A Herança Cultural

Ao longo da História da Humanidade, uma imensa variedade de bens patrimoniais foi sendo produzida, utilizando para isso várias matérias-primas, que podem ter características muito diferentes e de que são exemplo a pedra e diversos minerais, o papel, peles de animais, carapaças de tartaruga, entre outros (Figura 1).

Para além dos materiais de suporte, também as ornamentações podem ser extremamente variadas, como por exemplo, algumas das tintas utilizadas eram constituídas por pigmentos minerais unidos com ligantes orgânicos (que podem ter origem em gemas de ovo, caseína, linhaça, sementes de papoila, óleo de semente de cânhamo, óleo de madeira chinês e diferentes resinas). É também reconhecido que eram utilizadas colas de pele de coelho na preparação de telas de linho antes de ser efetuada a pintura, e que se empregavam colas orgânicas, linhaça ou óleo de terebintina na aplicação de folha de ouro em madeiras preciosas ou molduras de estuque. Para além bens já apresentados, os documentos escritos, como livros e pergaminhos produzidos a partir de papel, papiro ou pele de animais, são também parte integrante do Património Cultural, servindo de testemunho para toda a Humanidade. E, são também exemplos de bens patrimoniais, as esculturas e outros objetos de arte que foram concebidos através de uma grande variedade de materiais, como pedra, têxteis, pele, palha, barro, cabelo natural ou penas [9].

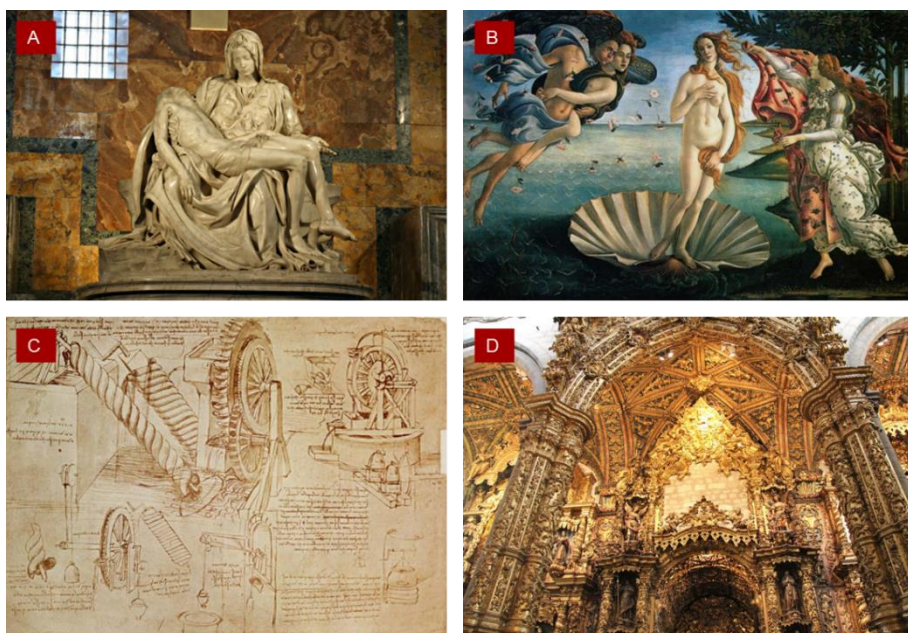
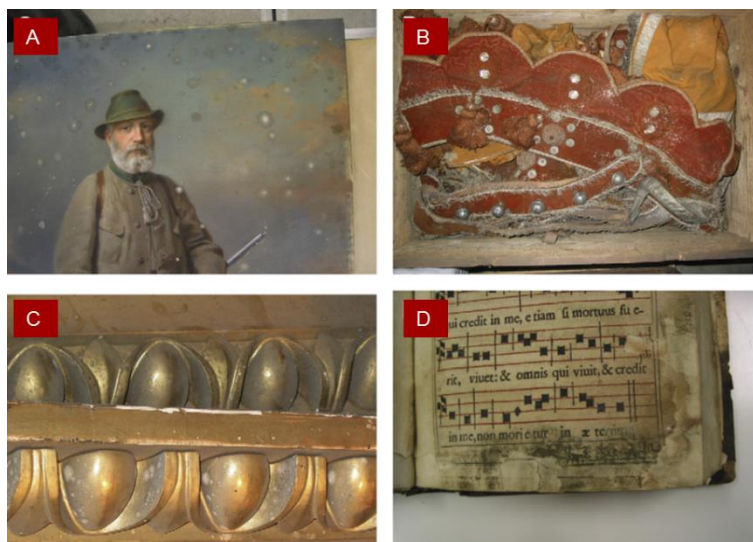


Figura 1 - Exemplos de obras de arte. A - *Pietà*, de Michelangelo; B - *O Nascimento de Vénus*, Botticelli; C - Página do "Codex Atlanticus", de Leonardo da Vinci; D - Talha dourada da Igreja de São Francisco, Porto

Esta grande variedade de materiais tem sido utilizada em diversos monumentos e obras de arte, cuja constituição pode sofrer alterações físicas, químicas e estéticas provocadas por fatores físicos, químicos e biológicos. Estes fatores vão desde

poluentes ambientais (inorgânicos e orgânicos), a agentes climáticos - temperatura, humidade, chuva e outro tipo de precipitação, exposição solar -, tratamentos químicos que podem incluir biocidas, agentes tensioativos e compostos hidrofóbicos, bem como a presença/atividade metabólica de microrganismos. Todas estas alterações podem causar danos, alguns irreversíveis, nos objetos de arte e, nos casos mais graves, pode ocorrer a sua completa destruição [6, 10, 11].

Recentemente, a importância dos microrganismos, designadamente bactérias, fungos e algas, nos processos de deterioração dos materiais utilizados em bens de valor histórico e cultural tem ganho enorme relevo. Sabe-se que todas as superfícies, tanto sob condições naturais como artificiais estão expostas a contaminação microbiológica, e vários estudos mostraram que os microrganismos têm um papel fundamental nos processos de deterioração não só de materiais orgânicos mas também de pedras, vidros e metais [6, 12]. A figura 2 apresenta alguns exemplos de obras de arte com evidentes sinais de contaminação microbiológica. Os processos de alteração em que os danos são causados por microrganismos, como resultado das suas atividades metabólicas, designam-se por biodegradação / biodeterioração. Os processos de biodeterioração / biodegradação são fenómenos complexos que ocorrem em conjunto com outras causas de degradação, sendo geralmente considerados processos de degradação secundária que ocorrem após efeitos deteriogénicos iniciais, produzidos por outros agentes, e estão intimamente relacionados com fatores ambientais e de ação humana [6, 12-14].



*Figura 2 - Obras de arte afetadas por biodeterioração/biodegradação. A - Pintura a pastel com contaminação fúngica devido ao acondicionamento em película de plástico. B - Bolor em vestes provenientes da Áustria. C - Molduras históricas em folha de ouro contaminadas por fungos. D - Camada densa de *Trichoderma sp.* num livro histórico. (Adaptado de Sterflinger et al., 2010).*

Este é um tema de extrema importância para a conservação da Herança Cultural, uma vez que as obras de arte e os monumentos representam um grupo bastante diversificado de nichos ecológicos para vários organismos [6, 12-16].

Os processos de biodeterioração / biodegradação das obras de arte são determinados pelos parâmetros específicos do material em estudo, o seu estado de conservação, as condições ambientais circundantes, e a morfologia da estrutura dos agentes colonizadores [17].

Um dos parâmetros que mais influencia a intensidade dos ataques biológicos e dos processos de biodeterioração / biodegradação é a disponibilidade de água, uma vez que, em condições de humidade adequadas, os microrganismos são capazes de se desenvolver utilizando como substrato o próprio material, poeira ou outros microrganismos. Além disso, a população microbiológica inerente a este fenómeno está associada a uma sucessão de agentes de colonização, que é influenciada pelo ambiente em que esta se encontra [17-20].

Em ambientes exteriores e/ou com luminosidade suficiente, as algas e as cianobactérias são os primeiros microrganismos a colonizar as obras de arte devido às suas características fotossintéticas, abrindo assim caminho para bactérias, fungos e outros microrganismos, que posteriormente se fixam ao substrato, tendo também eles um papel importante na deterioração. No caso de ambientes interiores, com ausência ou luminosidade reduzida, os primeiros agentes de colonização apontados são as bactérias, devido às reduzidas necessidades nutricionais requeridas, fornecendo posteriormente matéria orgânica para as comunidades subsequentes. Assim, a população colonizadora de obras de arte é fortemente influenciada pelos fatores externos, podendo sofrer alterações ao longo do tempo, sendo desta forma pertinente o controlo da dinâmica de populações para estudos de biodeterioração / biodegradação [17-20]. Para além disto, existem vários fatores e processos biológicos que podem influenciar não só a localização e extensão dos danos induzidos por microrganismos, mas também a estabilização da própria superfície/material [11].

Devido à enorme importância histórica, cultural e social dos bens patrimoniais, é necessário aprofundar o conhecimento dos efeitos dos microrganismos nestes bens culturais. Todo este processo visa a utilização da informação recolhida para encontrar estratégias de conservação e restauro cada vez mais eficazes. Em primeiro lugar, é necessário identificar os microrganismos envolvidos nos processos de biodeterioração / biodegradação – o que vai ajudar na compreensão da diversidade microbiana, das várias fases de colonização, da relação entre as várias comunidades microbianas presentes nas superfícies e da interação entre os microrganismos e o substrato. Sendo para isso necessário conhecer a interação entre diferentes microrganismos e

os seus diferentes padrões de biodeterioração / biodegradação, pois estes detêm um papel importante em todos os ecossistemas e, quanto mais complexo for o ambiente circundante, mais difícil será obter todo o espectro de microrganismos presentes [6-8, 14, 21, 22].

Identificar estes microrganismos específicos é de extrema importância não só porque representam um risco para os artefactos, mas também devido aos potenciais riscos para os conservadores, aquando da exposição a estes agentes, bem como para o ser humano em geral, pois o crescimento microbiano pode causar a emissão de células (esporos) ou dos seus metabolitos para o ar. Estas emissões estão relacionadas com efeitos adversos na saúde, como sintomas respiratórios, asma e alergias [20, 21].

Apesar da importância inerente à identificação dos microrganismos que proliferam nas obras de arte, os investigadores são confrontados, muitas vezes, com a impossibilidade de recolher amostra (utilização de técnicas não invasivas) ou de esta ser de dimensões muito reduzidas (microamostragem). Exemplos de amostragens podem ser encontrados na figura 3. Assim, um dos principais desafios para ultrapassar os problemas associados ao diagnóstico de contaminação biológica em bens patrimoniais prende-se com o desenvolvimento de processos de amostragem não invasivos [2, 12].



Figura 3 - Amostragem. A - Convento de Nossa Senhora da Saudação, Montemor-o-Novo. B - Convento de Cristo, Tomar

De acordo com estas limitações, o estudo destes objetos deve ser feito, sempre que possível, sem modificar os próprios objetos, especialmente se estes são de pequenas dimensões e de elevado valor cultural [2, 12].

Para além das dificuldades inerentes ao processo de amostragem, é difícil perceber o mecanismo de deterioração biológica, devido à complexa natureza das alterações bioquímicas e biofísicas que levam à biodeterioração dos monumentos e obras de arte. Assim, a compreensão dos processos que induzem a degradação do Património

Cultural, bem como medidas preventivas para controlo de contaminação microbiológica, só podem ser alcançadas através de uma investigação multidisciplinar, onde participem sobretudo biotecnólogos, bioquímicos, biólogos, químicos e conservadores/restauradores [6, 10, 15].

2.2. Os fungos como agentes biodeteriogénicos

Os fungos são responsáveis por uma grande variedade de processos de manutenção dos ecossistemas. Alguns deles, como as leveduras, os bolores e os cogumelos, desempenham um papel considerável na cultura e na evolução da sociedade desde tempos ancestrais. As leveduras têm sido utilizadas no fabrico de produtos alimentares, os cogumelos são utilizados eles próprios como alimento e vários microrganismos servem de base para a produção de antibióticos. No entanto, contrastando com os seus numerosos efeitos benéficos, os fungos também têm um lado negativo – sendo as micotoxinas, a patogenicidade, os alergénios, o apodrecimento de alimentos e a biodeterioração/biodegradação de materiais alguns dos exemplos [9, 23].

O crescimento fúngico em objetos de Herança Cultural está associado à degradação de substâncias orgânicas e minerais para obter nutrientes e extrair energia; à produção de moléculas, como ácidos e agentes complexos, com o objetivo de diminuir a coesão do substrato; e à excreção de excedentes metabólicos, o que pode causar danos indesejáveis [24]. Os principais danos ocorrem devido a alterações físicas ou mecânicas, mudanças químicas da matriz e alterações estéticas, sendo estes considerados indicadores de contaminação microbiológica [10]. Assim, a proliferação destes microrganismos provoca deterioração estética devido à formação de colónias e aos pigmentos fúngicos, bem como degradação estrutural, em que os fungos filamentosos penetram nas fendas e migram para o interior dos materiais, causando o seu destacamento, e degradando-os, o que afeta substancialmente os objetos [9]. As hifas formam rapidamente um grupo, designado por micélio, para colonizar áreas consideráveis do substrato onde se encontram e, por outro lado, os esporos produzidos através de estruturas especializadas, vão disseminar-se e contaminar outras superfícies, cuja proliferação pode causar danos irreversíveis nas obras de arte, merecendo por isso especial atenção [25].

A capacidade para formar biofilmes (*microfouling*), ou seja, a acumulação indesejável de microrganismos, dos seus produtos e depósitos (incluindo materiais orgânicos e minerais), e macro-organismos nas superfícies, como é visível na figura 4, é outro dos danos que habitualmente afeta a integridade dos bens patrimoniais. Estes filmes finos são geralmente constituídos por microrganismos embebidos numa matriz

orgânica de biopolímeros, produzidos pelos microrganismos em circunstâncias naturais. Adicionalmente, os precipitados microbianos, os minerais e os produtos de corrosão podem também coexistir. A formação de biofilmes é um pré-requisito para que a corrosão e/ou deterioração dos materiais subjacentes aconteça e estes podem causar alterações cromáticas na superfície dos objetos [11, 15].



Figura 4 - Biofilmes presentes em Angkor Thom, Cambodja. (Adaptado de Hu et al., 2013)

Os biofilmes podem desenvolver-se tanto em ambientes exteriores, como em espaços fechados, e apresentam um ambiente único, em que apenas os microrganismos adaptados às condições existentes têm a capacidade de crescer. As principais condicionantes à proliferação microbiana devem-se às mudanças constantes e imprevisíveis das condições ambientais nas superfícies subaéreas. Estes habitats estão muito dependentes da entrada de nutrientes e das condições atmosféricas, tendo por isso, desenvolvido a capacidade de se tornarem mais dependentes da interação interna entre diferentes microrganismos (elementos do biofilme) do que da entrada de nutrientes do exterior. Deste modo, as interações funcionais entre os diferentes componentes do sistema são de elevada importância [7, 11, 26].

Os primeiros colonizadores formam uma comunidade pioneira nas mais variadas superfícies que serve como base para as comunidades seguintes, sendo que os diferentes padrões de desenvolvimento de biofilmes dependem das condições ambientais e das interações internas dentro do biofilme. Todas as superfícies podem atuar como substrato para adesão de microrganismos e, consequentemente, para a formação de biofilmes, podendo o ataque dos microrganismos aos materiais ocorrer de forma direta ou indireta. Esta ação vai depender dos microrganismos intervenientes, das propriedades químicas e físicas dos materiais e das condições ambientais [9, 11, 15].

Na maioria dos habitats, onde a primeira fonte de energia (luz visível) está prontamente disponível e as fontes de carbono são limitadas, a colonização

microbiana geralmente inicia-se com organismos fotoautotróficos, que constroem um biofilme protetor, enriquecido com biomassa inorgânica e orgânica, nas superfícies. A acumulação de biomassa fotossintética providencia uma excelente base de nutrientes orgânicos para a subsequente microflora heterotrófica e as suas atividades biodeteriorogênicas. Apesar de provavelmente nem todos os biofilmes afetarem o substrato onde se depositam, está demonstrado que todos eles cobrem a superfície como um verniz fino e pigmentado [27, 28].

Os microrganismos que se encontram nos biofilmes tornam-se mais resistentes ao stresse ambiental sob condições de pouca humidade ou elevada temperatura porque os biofilmes contêm um elevado teor em água e possuem uma forte interação com a superfície do substrato [29].

No caso da interação simbiótica entre diferentes microrganismos, como, por exemplo, fungos e algas, os fungos utilizam os nutrientes orgânicos produzidos pelas algas durante a fotossíntese e, em troca, as algas obtêm minerais resultantes da degradação do substrato que ocorre através dos ácidos excretados pelos fungos. Para além disso, os fungos protegem as algas de condições ambientais hostis, tais como a dissecação ou a presença produtos químicos tóxicos [28].

Por outro lado, devido à elevada diversidade de exoenzimas produzidas pelos fungos e à sua grande habilidade de crescer a baixos valores de atividade da água (quantidade de água disponível numa matriz, o que permite o desenvolvimento dos microrganismos, e que está relacionada com a humidade relativa do ambiente envolvente), é necessário monitorizar a sua atividade enzimática, de forma a perceber a sua forma de ação e o seu papel no fenómeno de alteração de obras de arte [9].

Dos vários exoenzimas com proveniência microbiana, destacam-se os enzimas celulases, glucanases, lacases e queratinases, dada a sua importância como agentes deteriorogênicos.

As celulases (EC 3.2.1.4) são um dos exemplos de enzimas produzidas por fungos e provocam a endohidrólise das ligações 1→4-β-D-glucosídicas em celulose, lenhina e β-D-glucanos [30, 31]. Os estudos com estas enzimas encontram-se desenvolvidos com maior detalhe no ponto 2.3.1.

No que diz respeito às glucanases, estas promovem a degradação de β-1,3-glucano envolve ação de endo-1,3-β-glucanases (EC 3.2.1.6 e EC 3.2.1.39) e exo-1,3-β-glucanases (EC 3.2.1.58), sendo que os β-1,3-glucanos, compostos por resíduos de glucose β-1,3, são considerados componentes estruturais de maior importância da parede celular dos fungos e do revestimento extracelular das culturas fúngicas. Nas plantas também há produção algo semelhante a uma parede celular que está associada a β-1,3-glucano, e que está ligada ao desenvolvimento de pólen, formação

de placas celulares e respostas a stresse biótico e abiótico. Algumas algas também acumulam β -1,3-glucano como polissacarídeo de reserva. As endo-1,3- β -glucanases hidrolisam ligações β -1,3-glucosídicas internas em locais aleatórios para produzir oligossacáridos, e as exo-1,3- β -glucanases libertam glucose dos oligossacáridos produzidos. Pensa-se que as ações das 1,3- β -glucanases tenham um papel essencial na morfogénese e na aquisição de carbono da parede celular [32].

As lacases (EC 1.10.3.2), são oxidases com 4 átomos de carbono que podem ser produzidas por várias plantas, fungos e bactérias. Têm uma especificidade com o substrato relativamente baixa e elevada atividade catalítica [33]. Estes enzimas promovem a reação:



As queratinases (EC 3.4.21/24/99.11) são um grupo de proteases metálicas ou serinas que conseguem degradar a estrutura insolúvel formada por substratos de queratina. As queratinas são proteínas fibrosas insolúveis com ligações cruzadas de pontes dissulfureto, ligações hidrogénio e interações hidrofóbicas. A estabilidade mecânica das queratinas depende da intensidade do enrolamento das proteínas em estruturas de hélices α (α -queratina) ou folha plissada β (β -queratina), e da intensidade das suas ligações em pontes de cistina que têm um alto grau de ligações cruzadas através de ligações dissulfureto e ligações por ponte de hidrogénio [34, 35]. Estas proteínas são o principal componente estrutural de cabelo, lã, penas, unhas e outros tecidos epiteliais dos vertebrados. Devido às cadeias polipeptídicas extremamente enroladas, estas proteínas são resistentes a proteólise por proteases comuns como tripsina, pepsina e papaína. No entanto, diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos, estão identificados como utilizadores de queratina como substrato uma vez que produzem enzimas queratinolíticas [36, 37]. Como exemplo de aplicação, os microrganismos queratinolíticos e as suas enzimas podem ser utilizados para promover a degradação de queratina presente em penas, libertando aminoácidos que são utilizados pela comunidade microbiana circundante como fonte de azoto [38, 39]. Atualmente, a maioria dos estudos relativos a queratinases foca-se principalmente na sua ação proteolítica [40].

Há ainda escassez de informação sobre a especificidade dos fungos envolvidos nestes processos de biodeterioração, bem como sobre a restante população biológica, a ecologia, a evolução e a filogenia dos agentes biodeteriogénicos [9, 25, 41]. Para além disso, o tipo de fungos colonizadores e o seu consequente comportamento biodeteriogénico estão dependentes do material onde proliferam e, por isso, de modo

a melhor compreender os seus mecanismos, a sua ação deve ser analisada nos mais diversos materiais.

2.3. Materiais *versus* Bens Culturais

A compreensão dos fenómenos de alteração de obras de arte exige uma abordagem multidisciplinar, uma vez que, para além da caracterização dos diferentes componentes que constituem estes bens patrimoniais, a contaminação biológica e a acumulação de produtos de alteração nas superfícies também tem de ser contemplada. Assim, devido a toda a complexidade quer dos materiais, quer dos fenómenos que induzem alteração nos objetos de arte, para a realização deste trabalho foram estudadas várias obras de arte, produzidas a partir de diferentes materiais, tais como madeira, pedra, pintura mural, papel/pergaminho e marfim, predominantemente contaminados por fungos.

2.3.1. Madeira/Talha Dourada

A madeira é um dos mais antigos materiais de construção e decoração utilizado em vários tipos de obras de arte (Figura 5), como, por exemplo, esculturas, retábulos, coches, quadros, etc. De entre os vários tipos de obras de arte produzidas em madeira, a talha dourada é uma das mais importantes expressões artísticas em Portugal, atingindo o auge durante o período barroco devido ao simbolismo atribuído ao ouro durante o século XVII. Este tipo de técnica era aplicado na ilustração e narração do simbolismo católico e na decoração de várias estruturas [42].

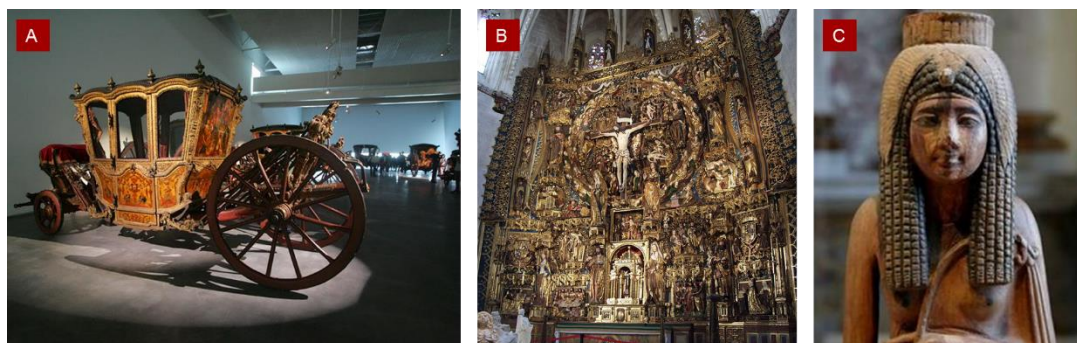


Figura 5 - Exemplos de obras de arte em madeira. A - Coche; B - Retábulo em talha dourada; C - Escultura.

A madeira é constituída por células ordenadas com paredes compostas por quantidades variáveis de celulose, hemicelulose e lenhina. Tipicamente, distinguem-se dois grupos, *hardwoods* (angiospérmicas) e *softwoods* (gimnospérmicas), obtidos das plantas angiospérmicas e gimnospérmicas, respetivamente, assim denominados por apresentarem diferentes concentrações dos compostos celulares (Figura 6). As *softwoods* contêm uma maior concentração de lenhina, menor concentração de

hemicelulose e aproximadamente a mesma quantidade de celulose, comparativamente com as *hardwoods* [43].

Apenas três espécies fúngicas são muitas vezes mencionadas como as mais frequentes em madeira interior na Europa: *Serpula lacrymans*, *Coniophora* spp. e *Antrodia* spp. [44, 45].

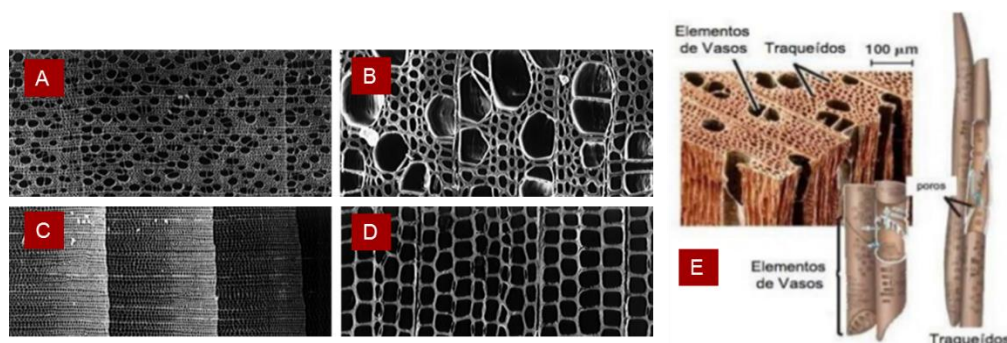


Figura 6 - A e B - estrutura celular de uma angiospérmica; C e D - Estrutura celular de uma gimnospérmica; E - Constituição do Xilema. (Adaptado de Blanchette, 2000)

Devido à sua constituição, a madeira é bastante suscetível a alterações (Figura 7A), sendo por isso pertinente estudar os fenômenos de biodeterioração/biodegradação causados em obras de arte (Figura 7B e 7C).

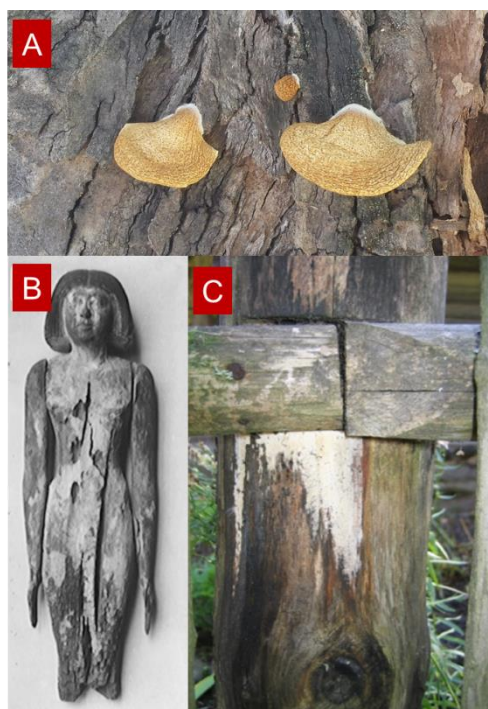


Figura 7 - Contaminação microbiológica em madeira: A – Árvore; B – Estátua egípcia (adaptado de Blanchette, 2000); C – Cerca do museu Open-Air (adaptado de Irbe et al., 2012)

A capacidade de degradação biológica dos componentes da madeira varia entre espécies da própria madeira e dos microrganismos que a contaminam. Essa variabilidade depende do complexo enzimático dos agentes fúngicos que vai quebrar a parede celular da madeira. As características de crescimento dos microrganismos e do

tipo de degradação resulta na produção de diferentes padrões de danos – dependendo do tipo de dano, diferentes alterações físicas, químicas e morfológicas ocorrem na madeira [43, 44].

Os materiais de madeira com conteúdo de humidade abaixo de 20% não permitem o crescimento fúngico, enquanto que quando as condições variam de 20% ao ponto de saturação das fibras (aproximadamente, 27%) é possível o desenvolvimento localizado de fungos. O pH da madeira é também um importante fator que poderá influenciar o tipo de microrganismos que se vão estabelecer na madeira, sendo que os microrganismos têm maior capacidade de se desenvolver em pH básico [43, 46].

A biodeterioração / biodegradação da madeira ocorre principalmente em espaços interiores (cerca de 86%) e é causada por enzimas e mediadores de baixo peso molecular excretados pelos fungos durante a sua atividade metabólica para obter uma fonte de carbono, essencial para a sua sobrevivência [22]. Em condições ambientais apropriadas, a madeira pode ser degradada por fungos que causam apodrecimento castanho (*brown-rot fungi*), branco (*white-rot fungi*) ou mole (*soft-rot fungi*). Enquanto que no apodrecimento castanho ocorre a degradação seletiva dos hidratos de carbono estruturais (celulose e hemicelulose); no apodrecimento branco há a degradação de todos os constituintes estruturais das paredes celulares, inclusive da lenhina; e no apodrecimento mole ocorre uma degradação seletiva da camada S2 da parede celular, o que deixa o resíduo lignolítico alterado [43, 47].

Os fungos que provocam apodrecimento branco causam muitas vezes o branqueamento da coloração original da madeira. O apodrecimento mole, causado por fungos que são classificados taxonomicamente nas subdivisões *Ascomycota* e *Deuteromycota*, divide-se em dois tipos: i) tipo 1, caracterizado pela formação de cavidades longitudinais na parede secundária das células da madeira, e, ii) tipo 2, utilizado para descrever a erosão de toda a parede secundária. O apodrecimento mole é considerado o que gera maiores perdas na madeira e os fungos que o causam são tolerantes a uma gama muito mais alargada de condições (conseguem tolerar uma vasta gama de condições de temperatura, humidade e pH que desencorajam a atividade de fungos de apodrecimento branco e castanho), sendo até encontrados em madeiras excessivamente húmidas ou secas [43-45, 47, 48].

O apodrecimento castanho é caracterizado pela rápida perda de coesão causada pela despolimerização de frações celulósicas, o que resulta numa perda de massa, redução da cristalinidade da celulose, e acumulação de açúcares parcialmente degradados [49].

O ácido oxálico é produzido pela maioria dos fungos causadores de apodrecimento castanho durante a primeira fase do metabolismo primário, sendo encontrado em

grandes quantidades nestes fungos, enquanto que em fungos de apodrecimento branco é detetado em quantidades reduzidas. Este tipo de apodrecimento é peculiar, pois os fungos que causam apodrecimento castanho são os únicos organismos conhecidos que conseguem degradar a celulose, não afetando a lenhina [22, 49].

A lenhina confere resistência mecânica às plantas e, devido à sua complexidade química, muitos poucos organismos têm a capacidade de a degradar. No entanto, certas bactérias e fungos, e em particular fungos que provocam apodrecimento branco na madeira, estão entre os organismos capazes de despolimerizar e mineralizar eficientemente a lenhina. Estes fungos desenvolveram um sistema complexo de enzimas com capacidades de degradação da lignocelulose, contendo peroxidases, oxidases e redutases e compostos de baixa massa molecular que regulam a ação destas enzimas. Estas enzimas lignocelulolíticas, compostas por celulasas e xilanases, são necessárias para fazer um bom uso dos componentes da biomassa lignocelulósica, as celulosas e hemicelulosas, para produzir açúcares como pentoses e hexoses para bioprocessos [30]. O grupo mais significativo de fungos que provocam apodrecimento branco que secreta estas enzimas pertence ao filo *Basidiomycota* [50].

As celulasas são complexos multi-enzimáticos que promovem a solubilização da estrutura complexa e rígida da celulose em monómeros e oligómeros pequenos o suficiente para permitir a assimilação celular. Os três maiores componentes das celulasas - endo-glucanases, exo-glucanases e β -glucosidades - atuam sinergeticamente durante a hidrólise enzimática [31, 51].

Apesar da vasta informação existente sobre este material, é necessário explorar ainda melhor o papel dos fungos presentes em madeira e que degradam a mesma, e estudar as suas enzimas lignolíticas [50].

2.3.2. Pedra

Na natureza, as alterações na composição de materiais pétreos expostos ao ar, são provocadas por diferentes agentes químicos, físicos e biológicos, que promovem a produção de bio-minerais e/ou os mecanismos de erosão. Este processo é designado por intemperismo [19].

A pedra é vastamente utilizada para a construção de monumentos e esculturas, no entanto os processos de biodeterioração / biodegradação afetam não só a estética destas obras de arte, mas também a estrutura das edificações, o que pode pôr em causa a segurança dos locais circundantes (Figura 8).



Figura 8 - Efeitos da bioterioração/biodegradação em edifícios edificados em pedra. A - Convento de Cristo, Tomar. B - Palácio da Pena, Sintra (Adaptado de Macedo, 2009)

No decorrer da contaminação microbiana, as propriedades físico-químicas do próprio substrato mineral são alteradas significativamente, aumentando a sua bioreceptividade [28], tornando-o assim, mais suscetível para sofrer alteração e, conseqüentemente, para o fenómeno de biodeterioração / biodegradação, que, neste caso envolve numerosas interações entre organismos, substratos e condições climáticas, originando vários padrões de biodeterioração / biodegradação [52].

De acordo com estas interações, a colonização biológica é afetada pela sua origem geológica (rochas metamórficas, sedimentares e magmáticas), pelas características físicas (rugosidade, porosidade, permeabilidade, morfologia da estrutura, etc) e químicas (composição mineral e pH da superfície) do substrato, sendo também fortemente influenciada pela atividade da água, estado de conservação da obra (erosão, micro-fissuras, etc), e pelas condições ambientais [18]. É possível destacar, por exemplo, a influência da rugosidade das superfícies, verificando-se que edifícios com superfícies rugosas revelam maior resistência à formação de biofilmes do que superfícies lisas [19, 28].

Investigações sobre biodeterioração / biodegradação em monumentos pétreos, especialmente no que diz respeito a biofilmes que cobrem a superfície para se protegerem contra fatores ambientais adversos, concluíram que a ação dos microrganismos pode ser claramente detetada em estados iniciais da degradação da pedra [28].

As obras de arte edificadas em pedra podem ser colonizadas por diferentes grupos de microrganismos, abrangendo bactérias (incluindo actinomicetes), algas (incluindo cianobactérias), fungos e líquenes, sendo que os fungos do género *Cladosporium*, *Alternaria* e *Fusarium* têm sido particularmente encontrados em calcários [53]. Todos estes microrganismos podem provocar: alterações cromáticas na pedra produzidas por pigmentos biogénicos, o que, dependendo da extensão da área que ocupem, pode

alterar a aparência estética e consequentemente a interpretação da obra de arte; stresse mecânico na estrutura mineral; e acumulação de poluentes atmosféricos absorvidos pelos biofilmes. Em monumentos de edificados em pedra, os fungos do solo, assim como a flora proveniente das plantas e do ar, são os primeiros habitantes destes materiais. Por outro lado, a biomassa natural acumulada pelos microrganismos fotossintéticos e por poluentes antropogênicos de origem industrial e agrícola poderá ser a fonte de nutrientes para os próximos microrganismos colonizadores da pedra, cuja atividade metabólica é influenciada por parâmetros naturais, tais como luz e humidade. A presença de comunidades microbiológicas é geralmente resultado da colonização sucessiva por diferentes microrganismos decorrente de vários anos, sendo um processo que depende da capacidade de um substrato providenciar um nicho protetor onde os microrganismos se podem desenvolver [8, 11, 18, 19].

A produção de ácidos orgânicos, como, por exemplo, de oxalatos também está envolvida na biodeterioração / biodegradação da pedra e de substratos minerais, materiais lignocelulósicos [54].

Foi estimado que 20-30% da deterioração de pedra resulta de atividade biológica e, em ambientes ao ar livre, os fungos e os líquenes são os mais importantes agentes de biodeterioração / biodegradação de monumentos históricos e esculturas edificadas em pedra (e também em argamassa e gesso), apesar de bactérias, cianobactérias e algas também poderem colonizar e deteriorar este material [9, 13]. Podem ser considerados dois tipos de biodeterioração / biodegradação: biogeofísica (dano mecânico causado pela exerceção de pressão durante o crescimento biológico) e biogeoquímica (ação direta causada pelos processos metabólicos dos organismos no substrato). Enquanto que os efeitos e extensão dos processos de deterioração biogeoquímica são controlados e determinados pela composição química dos minerais, o que faz com que o mecanismo de degradação mais conhecido e maioritariamente investigado seja provavelmente a libertação biogénica de ácidos corrosivos; os mecanismos biogeofísicos são na sua maioria regulados pela porosidade e forma da superfície interior das rochas, resultando no destacamento da superfície, perdas superficiais, ou penetração e aumento da porosidade.

Este tipo de deterioração também ocorre devido à presença de biofilmes de cianobactérias e algas que passam por grandes variações de volume e exercem uma força considerável durante os ciclos de secagem e humedecimento, fazendo com que os grãos de pedra se soltem. Isto pode levar à alteração da distribuição do tamanho dos poros na pedra, o que leva a alterações nos padrões de circulação de água e na resposta à temperatura. Para além disto, a formação de crostas induzidas pelo crescimento de cianobactérias e algas também resulta numa maior retenção da

humidade na superfície da pedra, tornando-a assim mais suscetível para colonização [8].

No entanto, é de referir o papel duplo dos organismos, pois a colonização pode por vezes também ser considerada bioprotetora e muitos autores defendem que alguns organismos, especialmente líquenes, não deveriam ser removidos das superfícies pétreas em certas condições, porque a biodeterioração / biodegradação provocada por eles causa menos danos do que os processos físico-químicos ambientais que ocorrem na sua ausência [52].

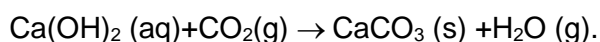
2.3.3. Pintura Mural

As pinturas murais constituem uma riqueza de valor incalculável para a Humanidade, tanto pela sua quantidade como qualidade, encontrando-se principalmente na Europa. Este tipo de pintura é bastante encontrado em igrejas, palácios, cavernas, entre outros [55, 56].

A pintura mural é um tipo de pintura que é realizada sobre um suporte arquitetónico de natureza diferenciada. O suporte (ou muro) pode ser constituído por taipa, tabique, alvenaria de pedra ou tijolo, paredes de pedra solta ou pedra emparelhada com um ligando entre blocos, ou até rocha natural [55-57].

Este tipo de pintura apresenta uma estrutura em camadas, composta por vários estratos que constituem o suporte pictórico (camada de baixo, constituída por uma ou mais argamassas de composição idêntica ou diferenciada) e a camada cromática (a camada ou camadas de pintura em si – formada por pigmentos e ligantes) [55, 56, 58].

As pinturas murais podem ser classificadas de acordo com a técnica de execução: *a secco*, *a fresco* ou pode também ser usada uma técnica mista. Na técnica *a fresco*, os pigmentos são depositados sobre uma argamassa ainda húmida, ou seja, no início do processo de carbonatação. A sua fixação decorre da formação superficial da matriz de carbonato de cálcio formada pela reação do hidróxido de cálcio contido nas argamassas com o dióxido de carbono da atmosfera [56]. Este processo pode traduzir-se na seguinte reação:



Na técnica *a secco*, os pigmentos são colocados sobre a superfície já seca. Neste caso, devem ser misturados com um material que promova a sua adesão ao suporte pictórico. Considera-se que a pintura mural efetuada a partir desta técnica é de, uma forma geral, mais frágil e menos duradoura que a técnica *a fresco*, devido à natureza orgânica do aglutinante, que está mais suscetível à degradação por agentes exteriores [56].

A preservação deste tipo de obras de arte é imperativa, devido ao seu enorme valor histórico-cultural e à enorme ligação aos antepassados da Humanidade [55].

As pinturas murais, tal como os bens culturais já apresentados, podem ser afetadas por fatores ambientais, condições geológicas do solo, qualidade dos materiais, o modo de preparação das pinturas, e microrganismos. Várias comunidades microbiológicas podem estabelecer-se nas interfaces das pinturas murais, mesmo em condições ambientais hostis ou condições químicas adversas [26, 55].

Estas obras de arte podem estar sujeitas ao crescimento de bactérias litotróficas e heterotróficas, actinomicetes, cianobactérias, fungos e algas microscópicas. Geralmente, humidade elevada, em conjunto com condições de luminosidade adequadas, e uma entrada constante de nutrientes parecem ser fatores determinantes para o crescimento biológico. Contudo, quando luz suficiente (natural ou artificial) atinge a superfície da parede, a proliferação de microrganismos fotoautotróficos parece ser dominante. Estes são principalmente microalgas e cianobactérias capazes de crescer mesmo em condições de luminosidade reduzida, e de sobreviver a longos períodos de escuridão. Porém, nos processos biodeteriorogénicos da pintura mural, o papel dos microrganismos fotoheterotróficos – menos abundantes – não deve ser negligenciado [26, 55, 57].

O crescimento fúngico em pinturas murais pode causar danos estruturais nos artefactos, sendo o destacamento a mais frequente causa de danos nas pinturas murais, particularmente no enorme espólio de pintura mural executada *a fresco* [55]. Outro dano comum da pintura mural é o desenvolvimento de fissuras, que são facilmente explicadas pelo crescimento e pressão dos fungos que frequentemente colonizam as pinturas murais [11]. É também de destacar a produção de oxalatos de cálcio ou de outros elementos químicos, a partir da calcite ou de pigmentos contendo metais presentes na tinta utilizada, que pode causar eflorescências, fissuras, destacamentos, assim como alterações na coloração e manchas nas pinturas (Figura 9) [54].



Figura 9 - Danos comuns provocados pela biodeterioração/biodegradação das pinturas murais. A - Alterações cromáticas; B - Fissuras.

Outro exemplo de biodeterioração / biodegradação são as manchas pretas causadas por fungos dematiáceos (“fungos negros”), que causam problemas na conservação dos bens patrimoniais. Estas manchas fúngicas podem ser originadas principalmente a partir da excreção de metabolitos ou pigmentos fúngicos, especialmente melaninas. A pigmentação mantém-se nas paredes celulares na superfície do substrato mesmo depois dos fungos já não estarem viáveis, sendo estas substâncias particularmente resistentes à degradação química e enzimática [59].

Assim, fazer um diagnóstico pormenorizado sobre os danos e a contaminação microbiológica, coordenado com tratamentos de consolidação e conservação e restauro torna-se fundamental, de forma a promover a preservação e salvaguarda destes bens patrimoniais [55].

2.3.4. Papel/Pergaminho

Desde os primórdios da Humanidade que os seres humanos têm feito por transmitir os seus pensamentos e conhecimentos às gerações seguintes. Bibliotecas, arquivos e museus conservam os documentos escritos e iconográficos, mas estes, tal como os outros materiais da Herança Cultural, estão sujeitos a numerosos processos de deterioração.

Existem dois tipos de agentes de degradação de papel: internos e externos. Os agentes internos estão ligados diretamente à composição do papel, em que são tidas em conta características como fibras, tipo de cola utilizada, resíduos químicos e partículas metálicas. Por outro lado, os agentes externos são constituídos por fatores físicos e biológicos, tais como radiação ultravioleta, temperatura, humidade relativa, poluição ambiental, microrganismos e outros seres vivos [3, 60].

Estas obras de arte podem sofrer vários tipos de danos, quer sejam estruturais ou estéticos. Numa primeira instância, os danos físicos, provocados principalmente devido a condições ambientais adversas, podem desencadear subsequentes processos químicos e microbiológicos deteriogénicos. No que diz respeito aos danos químicos, a produção de grupos carboxílicos ou radicais livres e processos de oxidação-redução podem envolver todos os constituintes do papel, e levar a um amarelecimento geral e enfraquecimento da estrutura do papel (Figura 9). A natureza das tintas, colas, impurezas e outros materiais orgânicos e inorgânicos podem influenciar fortemente, tanto negativa como positivamente, o envelhecimento do papel. O envelhecimento dos pergaminhos e a hidrólise química de cadeias de celulose podem também promover ataques de microrganismos. Este ataque induz vários danos no papel, que vão depender do tipo de agente colonizador. Alguns fungos filamentosos estão frequentemente associados à degradação do papel, tendo a capacidade de dissolver fibras de celulose através da ação de enzimas celulolíticas, ou de produzir pigmentos ou ácidos orgânicos que descoloram o papel e causam sérios danos nos objetos feitos a partir deste material [2].

Para além do exposto, outro fenómeno de deterioração encontrado em documentos escritos é designado por *foxing* – manchas aleatórias circulares e irregulares, cuja coloração pode ir de amarelo a castanho-avermelhado, encontradas na superfície do papel (Figura 10). Muitos autores demonstraram que os fungos têm um papel determinante no processo designado de *foxing* biológico [1, 25].

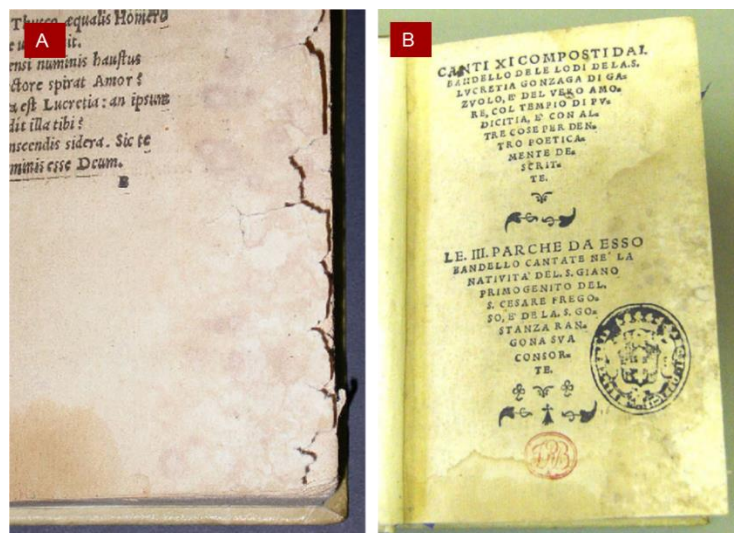


Figura 10 - Danos comuns em documentos escritos e iconográficos. A e B - manchas e desfragmentação do papel. (Adaptado de Michaelson, 2009)

No entanto, alguns estudos sugerem que a contaminação pode ocorrer, não só depois da finalização das obras de arte (no manuseamento destas ou na sua

exposição a fatores ambientais), mas também durante a fase do fabrico do papel ou da elaboração do objeto, sendo também um fator a ter em conta [1, 25, 61].

Em muitos dos casos de alteração destas obras de arte, os processos microbiológicos têm sido implicados na deterioração dos componentes orgânicos do papel, devido sobretudo à presença de fungos do género *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus*; e, num grau menor, de bactérias heterotróficas [3, 21, 61]. A presença destes microrganismos pode resultar na degradação irreversível destas obras de arte, sendo por isso necessário protegê-las dos agentes de degradação [3, 21, 61].

Estudos demonstraram que a contaminação microbiológica é dependente do material que colonizam, do ambiente de conservação, das condições do material, da antiguidade, do método de amostragem e da estratégia de análise. Por isso, cada objeto deve ser considerado como um exemplar único e com características específicas [2, 9, 60].

Neste tipo de material é crucial não só controlar o crescimento fúngico ativo, mas também remover ou reduzir a quantidade de esporos. As características dos ascósporos, que atuam naturalmente como geradores de crescimento fúngico continuado, permitem que os fungos sobrevivam a condições adversas, e consequentemente tornam os ascósporos mais difíceis de inativar do que as hifas vegetativas. Assim, qualquer tratamento de conservação deve dar especial atenção aos esporos, uma vez que as hifas vegetativas são relativamente fáceis de controlar através de remoção física e/ou por monitorização de condições ambientais dos locais de acondicionamento, como temperatura, humidade relativa e potencial hídrico [3].

No que diz respeito ao papel, a disponibilidade de água é considerada o maior fator que determina a taxa de colonização microbiana, uma vez que este é um material higroscópico, onde o conteúdo hídrico do artefacto está relacionado com os parâmetros microclimáticos de humidade relativa e temperatura. De facto, temperaturas acima de 23°C e humidade relativa acima de 65% leva a um aumento substancial do número de microrganismos nestes materiais [21, 62].

Para além do exposto, existe ainda uma estreita relação entre a biodiversidade microbiológica presente na atmosfera circundante e a microflora que coloniza os documentos em papel, desta forma investigações da contaminação aerobiológica dos locais onde estas obras se encontram são úteis para prevenir a sua biodeterioração/biodegradação. Assim, o controlo da instalação, manutenção e substituição dos filtros de ar ou dos sistemas de ar condicionado deve ser assegurado, de modo a evitar a circulação de agentes de contaminação [21].

Atendendo a este problema, a cooperação entre microbiologistas e conservadores de bibliotecas e de materiais de arquivo é essencial, sendo necessário coordenar os trabalhos de conservação e restauro com estratégias de mitigação que inibam a proliferação microbológica, de forma a promover a proteção destes bens patrimoniais. Assim, é necessário que as abordagens habitualmente utilizadas para reabilitação de documentos escritos e iconográficos sejam reavaliadas e coordenadas com os avanços e vantagens das metodologias microbológicas modernas, de forma a promover a salvaguarda destes bens [21].

2.3.5. Marfim

O marfim é o nome comercial pelo qual é conhecida a dentina – o constituinte principal dos dentes dos animais. A maioria dos objetos em marfim é esculpida a partir de dentes de elefantes, sendo que a dentina, produzida pelos odontoblastos, é o maior componente destes objetos (Figura 11). A dentina é um tecido mineralizado com uma matriz orgânica de proteínas de colagénio. Ao componente inorgânico da dentina dá-se o nome de hidroxiapatite carbonatada, cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)\text{H}_2\text{O}$ [63].

Ao longo dos séculos, o marfim foi utilizado para fazer esculturas, joalharia, incrustações em mobiliário, entre outros, tendo sido considerado um material de luxo e, levando assim, a uma exploração em larga escala, no continente africano e no asiático durante os séculos XVIII e XIX, que quase levou à extinção dos elefantes.



Figura 11 - Exemplo de uma peça de marfim. (Adaptado de Pinzari, 2013)

Os principais agentes de deterioração de peças de marfim são a luz, a temperatura e a humidade, e entre os vários tipos de alterações que ocorrem neste material são de

destacar a dilatação ou retração das peças (que podem provocar fissuras) e as alterações cromáticas

Os estudos de biodeterioração / biodegradação em peças de marfim ainda são escassos e há pouca informação a este respeito, mas sabe-se que a colonização do marfim e/ou exposição a atividades fúngicas levam à formação secundária extensiva de biominerais, principalmente como oxalato de cálcio mono-hidratado em simultâneo com a lixiviação da apatite do marfim [54].

2.4. Biodegradação: estratégia para uma abordagem polifásica

Devido à enorme complexidade dos bens patrimoniais, quer a nível dos materiais utilizados na sua construção, quer nos fenómenos que induzem a sua degradação, é necessário um estudo pormenorizado que permita a caracterização de todos estes parâmetros. Assim, dependendo da informação requerida, pode ser utilizada uma abordagem polifásica, combinando várias técnicas não-invasivas e/ou micro-invasivas, de forma a minimizar a intervenção e maximizar a informação recolhida. O uso de técnicas não-invasivas tem vindo a aumentar devido às melhorias no desenvolvimento dos instrumentos, sendo uma mais-valia para estudos de biodeterioração/biodegradação [13].

2.4.1. Métodos Clássicos dependentes de Cultura

Durante mais de 50 anos, a diferenciação de bactérias e fungos tem sido feita principalmente através de microscopia e da análise de metabolitos utilizando perfis de reações bioquímicas – os chamados métodos microbiológicos clássicos. Contudo, estes métodos baseados na cultura de microrganismos são demorados e tenham capacidade para identificar apenas uma pequena fração (menos de 1%) do número total das comunidades microbianas, sendo que a maioria dos microrganismos não pode ser cultivada *ex situ*, limitando assim o conhecimento dos microrganismos que proliferam nas obras de arte.

Existem várias razões para que esta percentagem seja tão reduzida, sendo que uma das principais é que os requisitos para o crescimento de certas espécies de microrganismos são desconhecidos. Para além disto, uma grande fração dos microrganismos em comunidades reais podem encontrar-se em estados inativos do seu ciclo de vida, e por isso mantêm uma atividade metabólica limitada durante um tempo específico, tornando difícil o seu desenvolvimento em meio laboratorial [6, 41, 64-66].

A maioria dos fungos isolados a partir de métodos microbiológicos clássicos são de crescimento rápido adaptados a níveis elevados de substrato, e possivelmente não

são os organismos dominantes no ecossistema de onde foram recolhidos [67]. No entanto, devido à variabilidade considerável da morfologia dos fungos, a microscopia, precedida do isolamento e incubação dos fungos em meios de cultura; ainda permanece uma ferramenta indispensável para a identificação individual de espécies.

As técnicas microscópicas habitualmente utilizadas para este propósito, incluem a observação e avaliação das características fisiológicas, como as diferentes estruturas reprodutoras, cor, forma, tamanho e tipo de superfície [6, 13, 25, 41]. Estas técnicas permitem uma avaliação quantitativa e qualitativa do ambiente investigado, ao utilizar uma metodologia em que as análises quantitativas são feitas por contagem nas placas e a determinação da atividade por unidades formadoras de colónias (ufc), ambas sendo analisadas com base no crescimento de microrganismos em meio de cultura seletivo [68].

No entanto, as técnicas convencionais não são suficientes para uma identificação correta da taxonomia microbiana, são demoradas e dependentes de vários fatores ambientais. Assim, vários estudos têm sido desenvolvidos para encontrar soluções envolvendo técnicas independentes de cultura. Recentemente, a utilização de técnicas moleculares para estudar os mecanismos de biodeterioração / biodegradação tem-se tornado um sucesso considerável, representando uma parte das abordagens polifásicas. Estas abordagens têm como objetivo aumentar o conhecimento sobre a diversidade microbiana envolvida no processo de biodeterioração / biodegradação [6, 10, 65].

2.4.2. Métodos Moleculares

As técnicas moleculares são baseadas na deteção/amplificação de sequências nucleotídicas específicas, e, uma vez que cada microrganismo contém sequências únicas, permite a diferenciação destes em comunidades microbiológicas complexas. Os resultados obtidos através deste tipo de abordagens moleculares têm revelado que a diversidade microbiológica é muito maior do que se pensava anteriormente com base unicamente nos métodos de cultura tradicionais. Como consequência, o conhecimento atual da diversidade microbiana presente no Património Cultural tem-se desviado da ideia clássica que apenas poucas espécies microbianas podem crescer nos bens culturais [6].

A identificação de fungos baseada na sequência genética tem muitas vantagens sobre os métodos convencionais, uma vez que não necessita de organismos viáveis, a especificidade é providenciada pelas sequências de ácidos nucleicos para identificação de microrganismos e não necessita de cultura prévia dos microrganismos [65].

Atualmente, existem diferentes técnicas genotípicas, principalmente baseadas em Reações de Polimerização em Cadeia (PCR), que têm sido desenvolvidas e adaptadas para fazer o *fingerprint* das comunidades microbianas em bens patrimoniais biodegradados [65, 68, 69].

Tem sido dada grande atenção a estudos filogenéticos de plantas, animais e fungos relacionados com sequências de genes de RNA ribossomal, para identificação de espécies. Os genes codificantes de rRNA são moléculas sinalizantes adequadas, pois a síntese de ribossomas tem sido fortemente conservada ao longo da evolução, devido ao papel central dos ribossomas na expressão genética. Os genes rRNA para as subunidades rRNA, apesar de não variarem muito em comprimento, contêm tanto regiões fortemente conservadas, como regiões variáveis nas suas sequências. Os genes para estas moléculas de rRNA estão também separados pelas regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que são bastante variáveis em comprimento e composição da sequência. Contudo, apesar de ter sido sugerida como código de barras para identificação das espécies fúngicas, a sequenciação da região ITS, nem sempre permite um bom agrupamento dos fungos do mesmo género/espécie, dado a natureza repetitiva do próprio rRNA e, conseqüentemente, a sua elevada taxa de mutações intra-específicas entre múltiplas cópias devido às fracas restrições seletivas. Assim, muitas vezes recorre-se também à sequenciação de genes que codificam proteínas, uma vez que estes acumulam menos mutações e são menos variáveis, sendo deles exemplo os genes que codificam a β -tubulina e a calmodulina [67, 70].

A amplificação por PCR associada a *primers* específicos permite também a deteção rápida e sensível de microrganismos e podem providenciar informação qualitativa ou semi-quantitativa quando utilizado com a eletroforese em gel, onde se visualiza o resultado da amplificação dos ácidos nucleicos. Contudo, técnicas baseadas na tecnologia de PCR fornecem apenas informação limitada do número e distribuição espacial dos microrganismos [64, 71]. No entanto, a técnica PCR continua a ser vantajosa para a análise de amostras muito pequenas, como as que são tipicamente recolhidas em objetos da Herança Cultural ou monumentos [13].

A identificação obtida através de PCR é extremamente sensível, permite detetar uma única molécula alvo (*target*) e pode também ser aplicada a amostras independentes de cultura. As técnicas de PCR *fingerprinting* permitem a discriminação de isolados que de outro modo não seriam distinguidos e introduz erros menores em comparação com os casos em que o PCR e outras análises são precedidos pela cultura. Contudo, quando estas técnicas de *fingerprinting* são aplicadas a amostras reais, elas não permitem distinguir entre células viáveis ou não viáveis, pois detetam

os ácidos nucleicos, e por isso não é possível quantificar os microrganismos a partir destes métodos [65].

Durante a reação de PCR, a sequência alvo de DNA é amplificada ao longo de ciclos de desnaturação-emparelhamento-extensão. E, enquanto que num PCR convencional, apenas a concentração final é monitorizada utilizando um corante fluorescente que se liga ao DNA, no PCR em tempo real, a quantificação dos produtos de PCR é feita durante a fase exponencial da reação. A deteção dos produtos de PCR é monitorizada ao medir o aumento da fluorescência causado pela ligação do corante à dupla cadeia de DNA. Estes corantes ligam-se ao fragmento amplificado (*amplicon*), no final de cada ciclo, sem o danificar para que a amplificação continue sem dificuldades, sendo que a intensidade de fluorescência emitida durante este processo reflete a concentração do fragmento amplificado em tempo real [72-74].

Atualmente, o PCR em tempo real representa uma ferramenta capaz de quantificar, de forma reprodutível e precisa, o conteúdo genético presente em amostras reais. Este método é vastamente utilizado em diagnósticos clínicos e ambientais, de modo a obter informação, qualitativa e quantitativa, fiável e aprimorada sobre as espécies microbianas. O PCR em tempo real tem como vantagens a sua capacidade de rápida quantificação de amostras, assim como a identificação ao nível da espécie. Para além disso, contrariamente ao PCR convencional, o PCR em tempo real não necessita de uma análise laboratorial pós-PCR, como a eletroforese em gel, tornando-o um método rápido e de realização fácil, a partir do momento em que o ensaio está otimizado e validado. No que diz respeito a custos, atualmente os equipamentos e os consumíveis estão economicamente acessíveis mesmo a pequenos grupos de investigação e são muito comuns em laboratórios de biologia molecular [64, 68, 71, 73].

Os métodos de biologia molecular são altamente específicos e têm alargado o conhecimento adquirido sobre os microrganismos não cultiváveis. Estes métodos beneficiam da variabilidade de sequências de DNA, que permitem determinar e diferenciar espécies e estirpes muito relacionadas, até em estados iniciais de contaminação, quando ainda nem estão visíveis. Mas, apesar dos enormes progressos e desenvolvimentos de técnicas genómicas, a informação taxonómica não pode provir apenas de uma técnica individual [41, 64, 65].

Atualmente, as técnicas moleculares estão muito bem estabelecidas e complementam os métodos microbiológicos clássicos no estudo dos microrganismos e o seu papel na Herança Cultural. A complementaridade destas abordagens permite uma melhor compreensão da diversidade microbiológica que habita nestes bens [68].

2.4.3. Métodos Espectrais

Os métodos espectrais apresentam algumas vantagens em relação aos métodos microbiológicos clássicos, uma vez que é possível utilizarem-se apenas microquantidades de amostra e, em muitos dos casos, não é necessário o isolamento dos microrganismos contaminantes. A partir da análise por estes métodos é possível obter as assinaturas espectrais dos fungos estudados para que sejam mais facilmente caracterizados e distinguidos [75].

2.4.3.1. Espectroscopia Raman

O potencial da espectroscopia Raman como técnica de identificação rápida e não-invasiva já está bem estabelecido. Em estudos biomoleculares, a espectroscopia Raman tem a vantagem de providenciar informação tanto sobre a composição química como sobre a estrutura biológica das moléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e hidratos de carbono, sendo que diferentes microrganismos produzem espectros únicos. A especificidade da técnica analítica em combinação com processos quimiométricos apropriados permite a caracterização, discriminação e identificação de bactérias, fungos e leveduras, tanto a nível de espécies como de sub-espécie. Atualmente, a espectroscopia Raman já é bastante utilizada para caracterização material dos bens patrimoniais, nomeadamente a identificação de pigmentos. No entanto, cada vez mais se considera que esta técnica é a candidata ideal para ser considerada uma alternativa não-invasiva para a identificação de microrganismos, sem recurso a reagentes, rápida, de confiança, fácil de manusear e pouco dispendiosa [76].

2.4.3.2. FTIR-ATR

A Espectroscopia de Infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) é uma metodologia ideal para caracterizar a composição de amostras quimicamente complexas. Este pode ser um método rápido de diferenciação e identificação de microrganismos, e o espectro de FTIR tem sido descrito como padrões de *fingerprintings*, que são extremamente característicos para diferentes espécies. Vários autores demonstraram que é possível diferenciar e classificar os microrganismos a diferentes níveis taxonómicos. Esta técnica tem sido aplicada com sucesso em várias áreas de controlo de qualidade e para a identificação de microrganismos. Esta técnica não tem sido utilizada apenas como método de identificação de isolados microbianos, mas também como técnica de *screening* para amostras reais, e como técnica de caracterização das condições dos nutrientes durante a formação de biofilmes microbiológicos. Para além disto, a espectroscopia FTIR-ATR possibilita a deteção de

alterações na composição molecular das células dentro de um ambiente microbiano complexo [77, 78].

No entanto, espécies de coleções laboratoriais de culturas podem ser bastante diversas tanto em morfologia como em fisiologia. Estas podem diferir em traços macro e micromorfológicos e podem ter perdido a sua capacidade para produzir os metabolitos característicos. Estas culturas podem degenerar e tornarem-se significativamente diferentes das estirpes nativas [78].

A espectroscopia FTIR oferece uma opção realística para a identificação de rotina de fungos, sendo menos demorada e menos dispendiosa comparativamente com técnicas moleculares. É geralmente aceite que a abordagem integrada que combina informação molecular e morfológica irá ajudar na resolução de problemas, tais como a transferência horizontal de genes e a homoplasia, o que é relevante tanto para estudos evolucionários como taxonómicos. A principal vantagem da espectroscopia FTIR é que providencia uma elevada quantidade de informação qualitativa e quantitativa e que o espectro revela um *fingerprint* fenotípico e genotípico [78].

2.4.3.3. MEV-EDS

A técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV) permite a observação e a caracterização das superfícies de materiais inorgânicos e orgânicos com uma maior resolução e profundidade de campo do que com a microscopia ótica convencional, permitindo ainda obter um perfil mais detalhado dos elementos presentes numa superfície através da análise por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS). A técnica de MEV-EDS permite identificar a composição elementar do material de suporte, das áreas colonizadas, dos depósitos abióticos e dos biofilmes, e consegue também determinar a presença, morfologia e distribuição dos microrganismos nos biofilmes [13].

2.4.4. Outros métodos para avaliação da colonização microbiana

Para além dos métodos acima referidos, existem outros métodos que podem ser uma mais-valia para a área da biodeterioração/biodegradação do Património Cultural, mas que não foram utilizados para a realização deste trabalho. As perspetivas futuras desta área de investigação podem passar por incluir estas tecnologias mais recentes em abordagens de caracterização polifásica de fungos biodeteriogénicos, para, deste modo, a qualidade da informação recolhida ser ainda mais precisa.

2.4.4.1. Hibridação *in situ* fluorescente

Desde a sua primeira aplicação em estudos de filogenia em 1989, as sondas oligonucleotídicas dirigidas ao rRNA, marcadas com fluoróforos, têm sido uma ferramenta muito útil para a identificação direta e independente de cultura de microrganismos. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) envolve o uso de sondas específicas, cujo alvo é o rRNA, que conseguem hibridar seletivamente os ácidos nucleicos quando células inteiras são preservadas com fixantes. As sondas detetam os microrganismos alvo sem ser necessário isolamento, e a esta tecnologia consegue detetar microrganismos em todos os níveis filogenéticos [64, 73, 79].

Através da técnica FISH é possível obter-se informação importante sobre a relação entre os microrganismos e a própria superfície [21].

Recentemente, esta técnica tem sido explorada na área da biodeterioração/biodegradação do Património Cultural e os resultados preliminares demonstraram que esta será opção bastante viável para diagnósticos futuros.

2.4.4.2. MALDI-TOF

A técnica de MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-Of-Flight*) é um método analítico, rápido e sensível, independente de reações metabólicas, utilizado para determinar a massa de compostos orgânicos não-voláteis e termolábeis, incluindo péptidos e proteínas. Esta técnica tem a capacidade de quantificar péptidos e outros compostos na presença de sais e de analisar misturas complexas de péptidos, tornando-se um método ideal para medir extratos não purificados e células intactas [80-82].

A identificação de microrganismos através de MALDI-TOF é baseada na análise do espectro de proteínas ribossomais. Consequentemente, os resultados aproximam-se bastante dos obtidos através de 16S-rDNA (para bactérias) e 18S-rDNA (para fungos); e as espécies que não diferem suficientemente nas suas sequências de proteínas ribossomais não podem ser distinguidas por esta técnica [66]. No entanto, esta tecnologia tem potencial para complementar a identificação fenotípica convencional para a maioria das estirpes de microrganismos isoladas em laboratórios de microbiologia. Para se obter uma correta identificação através da análise das colónias são necessários apenas alguns minutos, o que faz com que não só seja possível identificar os microrganismos ao nível da espécie, mas às vezes até ao nível da estirpe. Uma vez que deteta um largo espectro de proteínas, esta é uma técnica capaz de classificar microrganismos e discriminar entre espécies filogeneticamente relacionadas. As potenciais vantagens que a MALDI-TOF oferece em relação a outras técnicas de caracterização microbiana incluem a mínima preparação da amostra,

rapidez de resultados e o custo dos reagentes. Para a identificação de microrganismos utilizando esta técnica, podem ser aplicados algoritmos padrão de análise de sinais de massa e bibliotecas de referências de espectros de massa de microrganismos. Para a classificação, são geralmente utilizados os métodos de *clustering* e os resultados são visualizados em dendogramas [80-82].

A qualidade e reprodutibilidade dos *fingerprints* de MALDI-TOF são afetadas por diferentes fatores experimentais, tais como a preparação da amostra, o método de lise das células, a soluções da matriz e os solventes orgânicos. O espectro obtido pode também ser afetado por diferenças na performance dos instrumentos, na variação da massa e resolução espectral [81].

Têm sido desenvolvidas várias aplicações para esta tecnologia, incluindo a identificação de microrganismos baseada no espectro de massa único produzido por determinada espécie. Como diferentes espécies de microrganismos expressam uma série de proteínas com massas variadas, o espectro de massa produzido pela MALDI-TOF de uma espécie (ou até estirpe) específica tende a ser único. Estes *fingerprints* de espectros de massa de MALDI-TOF podem ser utilizados para discriminar microrganismos, incluindo bactérias e fungos [82].

Ao contrário das bactérias, as células fúngicas são de maior dimensão e a sua parede celular é mais rígida e a composição das paredes das células e dos esporos dos fungos exibem diferenças qualitativas e quantitativas, não só em relação a diferentes espécies de fungos, mas também entre diferentes estirpes da mesma espécie fúngica. No entanto, apesar de ser uma técnica útil para a análise de fungos, ainda têm sido relatadas várias limitações, como, por exemplo, os efeitos inibitórios de pigmentos fúngicos (como a melanina) nos espectros de massa adquiridos através de MALDI-TOF [41, 82, 83].

A determinação rápida e precisa de massa molecular e a possibilidade de automatização têm feito da MALDI-TOF uma alternativa real aos métodos microbiológicos e moleculares convencionais, sendo neste momento uma das mais credíveis ferramentas para a rápida e fácil identificação, diferenciação e classificação de microrganismos [41, 83].

As potencialidades de todas as técnicas descritas anteriormente sugerem que a sua aplicação combinada será uma mais-valia para estudos de biodeterioração / biodegradação do Património Cultural. Desta forma, neste trabalho vai adotar-se uma abordagem polifásica para caracterização de agentes fúngicos presentes em diversas obras de arte, através da combinação de técnicas morfológicas, moleculares e

espectrais, de modo a recolher a maior quantidade de informação possível, para que a identificação dos agentes fúngicos biodeteriogénicos seja rápida e eficaz. Na figura 12 apresenta-se uma representação esquemática das metodologias utilizadas. Assim, a integração de toda a informação recolhida permitirá uma maior eficiência dos processos de conservação e restauro, contribuindo para uma melhor preservação da Herança Cultural.

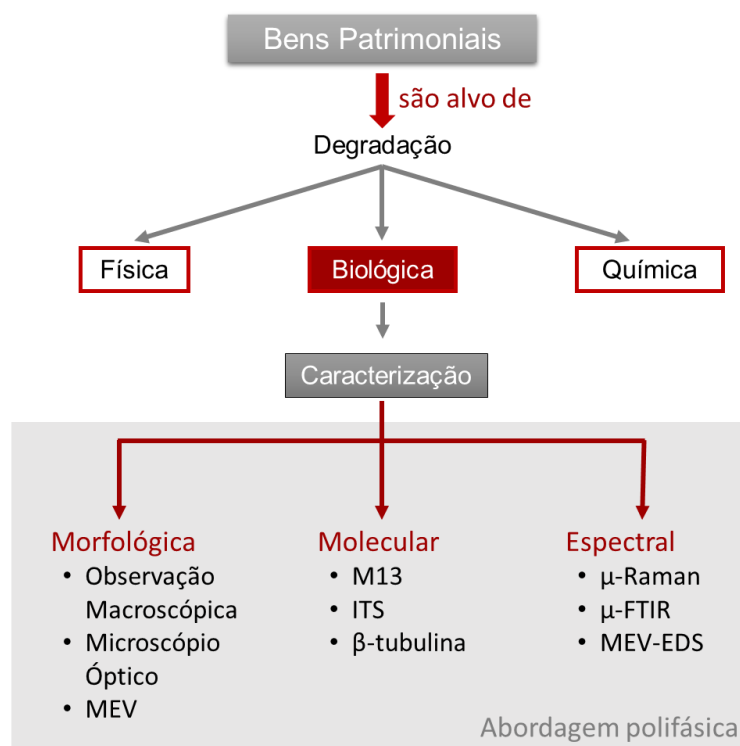


Figura 12 - Representação esquemática das metodologias utilizadas na realização deste trabalho

3. Metodologia



Este trabalho dividiu-se em quatro fases distintas: seleção dos fungos biodeteriogénicos e abordagem polifásica dos isolados fúngicos, baseada em: (i) caracterização morfológica; (ii) técnicas moleculares; e (iii) técnicas espectrais.

Todo o trabalho laboratorial foi efetuado tendo em conta as metodologias de assepsia necessárias. Em qualquer destas fases, a manipulação de microrganismos requer cuidados de assepsia quer do local de trabalho, do operador e da própria cultura, logo os processos de esterilização e de desinfeção são de elevada importância. Deste modo, todo o material e meios de cultura utilizados, tanto nas recolhas como nos procedimentos laboratoriais, foram esterilizados em autoclave e a bancada de trabalho foi desinfetada.

3.1. Manutenção de culturas fúngicas

Para este trabalho foram utilizados microrganismos previamente isolados de vários locais e artefactos de importância cultural, pertencentes à Coleção de Culturas da Unidade de Biodegradação e Biotecnologia do Laboratório HERCULES – Universidade de Évora. Os microrganismos selecionados são provenientes de diferentes bens patrimoniais, tais como: uma peça de marfim, um documento em papel (Inquisição de Lisboa) e um documento em pergaminho (Foral de Alvito) pertencentes ao espólio da Torre do Tombo, um altar de madeira ornamentado com talha dourada (Igreja do Colégio do Espírito Santo, em Évora), uma parede coberta com material pétreo (Sé de Évora) e quatro pinturas murais (Convento de Nossa Senhora da Saudação e Igreja de Santo Aleixo, ambos em Montemor-o-Novo, Igreja de Santa Clara, em Arraiolos, e Casas Pintadas, em Évora), com evidentes sinais de alteração.

Os isolados fúngicos em estudo provieram de amostragens em condições de semi-assepsia e, posteriormente, foram inoculados em meios de cultura específicos para o desenvolvimento das comunidades biológicas – neste caso foi utilizado meio Malte Extrato Agar (MEA) que é o mais adequado para o crescimento de agentes fúngicos (composição no anexo C). As culturas foram incubadas em placas de Petri durante 4-5 dias a 28°C e, seguidamente, efetuaram-se repicagens das diferentes colónias desenvolvidas até obtenção de culturas puras (Figura 13), as quais foram depois conservadas a 4°C.

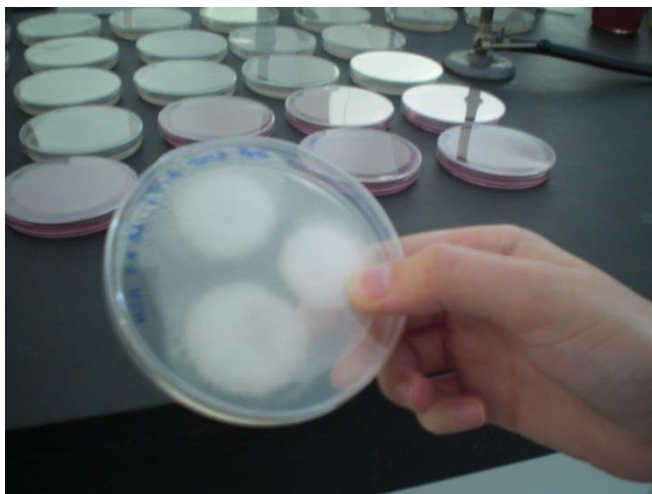


Figura 13 - Representação de um isolado fúngico

3.2. Caracterização morfológica

A identificação dos microrganismos recolhidos foi feita através de observação macroscópica e microscópica dos isolados fúngicos em estudo.

Os agentes fúngicos biodeteriogénicos foram inoculados em três meios de cultura: MEA, PDA (*Potato Dextrose Agar*) e CYA (*Czapek Dox Metal Agar*, VWR Chemicals, Radnor, Pensilvânia)), cujas composições se encontram no anexo C. Foram observadas as características morfológicas das colónias, tais como cor, textura, recorte, tamanho e a presença ou não de exsudado, nos diferentes meios de cultura. Esta observação foi monitorizada macroscopicamente, com simultâneo registo fotográfico, aos 3º, 5º, 7º, 10º e 14º dias de crescimento dos fungos, sendo que ao 14.º dia, as culturas fúngicas foram também observadas com a lupa binocular Leica M205 C, com a câmara Leica DFC295 acoplada.

No que diz respeito à observação microscópica, deu-se especial importância à morfologia das hifas e estruturas reprodutoras (no caso dos isolados esporulados). Para isso foram efetuadas preparações dos diversos isolados fúngicos, coradas com azul-de-metileno e, posteriormente, observadas ao microscópio ótico, cujas imagens foram adquiridas com a câmara MoticamPro 282B (Figura 14). Todos os isolados fúngicos foram ainda analisados por Microscopia Eletrónica de Varrimento (ver secção 3.4.3.).



Figura 14 - Microscópio Ótico (Motic BA410E).

3.3. Caracterização espectral dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram repicados e incubados durante 6-7 dias, para posteriormente serem analisados através de diferentes técnicas espectrais.

3.3.1. Análise por espectroscopia Raman

Os microrganismos isolados em placas de Petri foram analisados por espectroscopia Raman diretamente, utilizando o microscópio HORIBA Xplora Raman, com capacidade de ampliação de cem vezes e um detetor CCD (*Charge Coupled Device*) (Figura 17). Os espectros foram calibrados com uma pastilha de silicone, utilizando a banda $520,5\text{ cm}^{-1}$. A aquisição espectral foi efetuada utilizando o programa LabSpec e a identificação foi feita com *Spectral IDTM 13*, com os lasers de comprimentos de onda de 638 nm e 785 nm, e filtro de 10% a 50%, para evitar queimar os microrganismos em análise. O espectro *Raman* foi obtido pela acumulação de 5-15 aquisições de 10-20s e com uma resolução espectral de 5 cm^{-1} .



Figura 15 - Espectrómetro Raman (HORIBA Xplora Raman).

Metodologia

3.3.2. Análise por espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier com reflexão total acumulada (FTIR-ATR)

O espectro de absorção de infravermelhos dos fungos foi captado com um espectrômetro (Bruker ALPHA) equipado com um módulo de reflexão total atenuada (ATR – QuickSnap) acoplado com um cristal de diamante (Figura 18). O espectro de absorção de infravermelhos foi captado entre 4000 a 375 cm^{-1} , utilizando apenas o cristal de diamante como linha de base. Cada espectro é obtido através da média de três análises distintas em que cada uma resulta da acumulação de 128 scans com a resolução espectral de 4 cm^{-1} . A análise espectral foi efetuada com o *software* OPUS 6.0.



Figura 16 – Espectrômetro de infravermelhos com transformada de Fourier (Bruker ALPHA) com reflexão total acumulada.

3.3.3. Análise por Microscopia Eletrônica de Varrimento

Os agentes fúngicos foram analisados por microscopia eletrônica de varrimento acoplada a espectroscopia de raios-X (MEV-EDS) e observados pelo microscópio eletrônico de varrimento Hitachi S-3700N acoplado com o espectrômetro de energia dispersiva de raios-X Bruker XFlash 5010 (Figura 19), que permite a caracterização microestrutural e a identificação da composição elementar. A análise foi feita em vácuo com uma voltagem acelerada de 18-20 kV.



Figura 17 - Microscópio Eletrônico de Varrimento (Hitachi S-3700N) com espectrômetro de raios-X acoplado.

3.4. Caracterização molecular dos isolados fúngicos

3.4.1. Extração de DNA de fungos filamentosos

A metodologia aplicada no isolamento do DNA dos isolados fúngicos em estudo foi adaptada a partir de dois métodos muito utilizados para extração de DNA de fungos filamentosos: o método das microsfers [84] e o método do tiocianato de guanidina [85].

Os fungos em estudo foram inoculados em placas de Petri e, posteriormente, incubados durante 5-7 dias a 25°C. Finalizado o tempo de incubação, os fungos foram macerados e depois transferidos para microtubos de 2 mL, aos quais foram previamente adicionados 300 µL de microesferas. Seguidamente, foram acrescentados 700 µL de Tampão de Lise e os microtubos passaram então por 3 ciclos de 30 s de agitação no vórtex e 30 s no gelo.

Estes microtubos foram incubados durante 1 h, a 65°C, e, a meio desta incubação, foram repetidos os ciclos de agitação anteriormente referidos. Uma vez concluído o tempo de incubação, os microtubos foram centrifugados a 13500 rpm durante 10 min, a 4°C. Depois recolheu-se o sobrenadante, cerca de 500 µL, para microtubos de 2 mL e adicionaram-se 700 µL de RNase em Tampão de Eluição, com a concentração de 100 µg/mL. Os microtubos foram depois incubados durante 1 h a 37°C.

Após o término da incubação, adicionaram-se 600 µL de Clorofórmio/ Álcool Isoamílico (24:1) e misturou-se por inversão, e seguidamente centrifugou-se durante 10 min a 10000 rpm. Depois da centrifugação, foi recolhido o sobrenadante, cerca de 500 µL, para dois microtubos de 2 mL. Adicionou-se tampão Acetato de Sódio frio (1/10 do volume obtido anteriormente), 2,5 volumes de Etanol Absoluto frio (-20°C) e homogeneizou-se por inversão. Os microtubos foram centrifugados durante 15 min a 13000 rpm e decantou-se o sobrenadante. Depois, lavou-se duas vezes o sedimento

Metodologia

com 1 mL de Etanol a 70% e centrifugou-se a 10000 rpm durante 10 min, tendo-se o cuidado de retirar o máximo de sobrenadante.

Por fim, os microtubos ficaram a secar na estufa (37°C) e posteriormente o DNA extraído foi solubilizado com 100 µL de tampão TE e foram guardados a -4°C.

3.4.2. Extração de DNA de leveduras

Para a extração de DNA de leveduras foi utilizado um método adaptado de Rinta-Kanto *et al* [86].

Os microrganismos foram inoculados em rampas e incubados durante 4-6 dias a 25°C. Ressuspenderam-se as células em 100 µL de TE e adicionaram-se 15 µL de lisozima à suspensão celular. Agitaram-se suavemente os microtubos e foram a incubar a 37°C durante 20 min. Adicionaram-se 15 µL de α-quimiotripsina em 10% de SDS, os microtubos foram agitados suavemente e foram incubados a 50°C durante 30 min.

Adicionaram-se 100 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1), os microtubos foram agitados suavemente e centrifugados. Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo e adicionou-se 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1). Agitou-se suavemente e centrifugou-se.

Depois transferiu-se a fase aquosa e adicionaram-se 2 volumes de Etanol 100% e 0,3 volumes de Acetato de Sódio 3M, e os microtubos foram colocados a -20°C *overnight*.

Por fim, os tubos foram centrifugados a 11500 g durante 25 min e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se com 100 µL de Tampão de Eluição e guardaram-se as amostras a -20°C.

3.4.3. Quantificação de DNA

A fim de confirmar a presença de DNA e para ajudar na compreensão dos resultados obtidos por eletroforese, o DNA extraído das amostras foi quantificado por espectrofotometria de UV-Vis. Para tal, utilizou-se um µDrop Plate (Thermo Scientific MultiScan Go) com um *software* de quantificação acoplado (SkanTY RE MultiScan 3.2.), onde foram colocados 2 µL de cada amostra, ou 2 µL de TBE para o caso do branco.

A razão Abs_{260}/Abs_{280} indica o grau de pureza das amostras de DNA, tendo como valor ótimo 1,8. Se a razão for consideravelmente mais baixa, pode indicar a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvem intensamente a 280 nm ou nessa região.

Metodologia

A razão Abs_{260}/Abs_{230} é utilizada como uma medida secundária de pureza dos ácidos nucleicos, e os valores ótimos esperados variam entre 1,8-2,2. Se a proporção for consideravelmente mais baixa do que o esperado, pode indicar a presença de contaminantes que absorvem a 230 nm, nomeadamente EDTA, fenóis e glúcidos.

3.4.4. Amplificação de DNA

Para este trabalho foram realizadas diferentes abordagens de amplificação do DNA extraído: por RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*), amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e do gene da β -tubulina – este último gene também foi utilizado para a realização do PCR em Tempo Real. A variedade de amplificações é útil para se obter uma caracterização pormenorizada dos agentes fúngicos em estudo.

Tabela 1 - Primers utilizados nas várias reações de amplificação.

Primer	Sequência	Referência
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	Coton <i>et al.</i> , 2011 [87]
ITS-1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	Anderson e Parkin, 2007 [23]
ITS-4	5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Anderson e Parkin, 2007 [23]
ITS-5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	Anderson e Parkin, 2007 [23]
Bt-2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	Mongkolsamrit <i>et al.</i> , 2009 [88]
Bt-2b	5'-CAGTGTAAGTGACCCTTGGC-3'	Mongkolsamrit <i>et al.</i> , 2009 [88]

3.4.4.1. **RAPD-PCR**

A reação de RAPD-PCR foi efetuada para um volume final de 25 μ L contendo em cada amostras 19,8 μ L de água RNase Free, 2,5 μ L de tampão 10x *Dream Taq Buffer* com $MgCl_2$ 20 mM, 0,5 μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L de *primer* (M13, 50 μ M), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase 500 U e 1 μ L do DNA fúngico extraído das amostras. Juntamente com estas amostras, foi também utilizado um branco, que funcionou como controlo.

A amplificação por RAPD-PCR, realizada num termociclador (Figura 15), iniciou-se com um passo de desnaturação de 5 min a 94°C, ao qual se seguem 40 ciclos constituídos por: desnaturação de 1 min a 94°C, emparelhamento de 1 min a 50°C, e extensão de 2 min a 72°C. Por último, fez-se uma extensão final de 6 min a 72°C. Os fragmentos resultantes da amplificação foram guardados a 4°C até terem sido aplicados no gel de eletroforese.



Figura 18 - Termociclador para realização de Reações de Polimerização em Cadeia

3.4.4.2. ITS

Dentro do *cluster* de genes de rRNA, as regiões alvo mais utilizadas em estudos de comunidades fúngicas são as que codificam 18S rRNA e 25/28S rRNA, e a região ITS que incorpora o gene 5.8S rRNA. No entanto, as sequências não-codificantes ITS têm sido bastante utilizadas para identificação taxonômica a nível da espécie de fungos em *pools* naturais de DNA, devido à elevada variabilidade natural de evolução rápida destas regiões de rDNA, fornecendo assim mais informação taxonômica do que as sequências rRNA, e geralmente são selecionadas como sequências alvo em estudos em que a base é o DNA. Estas sequências providenciam ensaios de elevada sensibilidade quando utilizadas como sequência alvo devido ao seu elevado número de cópias no genoma fúngico, o que resulta numa maior variação de sequências entre espécies próximas, em comparação com regiões codificantes mais conservadas dos genes rRNA. Como resultado, a região ITS é a região para a qual atualmente há mais informação disponível na maioria das bases de dados de sequências para a identificação molecular de fungos. Adicionalmente, as sequências de DNA nas regiões ITS são extremamente variáveis e podem servir como marcadores para grupos taxonômicos mais distantes [1, 23].

O DNA é amplificado utilizando *primers* ITS fúngicos que têm como alvo a região do DNA ribossomal entre os genes 18S e 28S que contêm os dois ITS e o gene de rRNA 5,8S [67].

Ao amplificar as regiões ITS, podem ser reconhecidas diferentes espécies de fungos. Demonstrou-se que a região ITS2 está altamente conservada entre *Aspergillus* e *Penicillium* e assim a região ITS1 será promissora no desenvolvimento de sondas específicas para distinguir entre géneros [41].

A reação de amplificação com o *primer* ITS foi executada para um volume final de 25 µL, contendo em cada amostra 20,6 µL de água RNase Free, 2,5 µL de tampão 10x *Dream Taq Buffer* com MgCl₂ 20 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,1 µL de *primer*

reverse (ITS4 50 µM), 0,1 µL de *primer forward* (ITS1 50 µM ou ITS5 50 µM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase 500 U e 1 µL de DNA fúngico extraído das amostras. Juntamente com estas amostras, foi também utilizado um branco, que funcionou como controlo.

A amplificação de DNA com o *primer* ITS iniciou-se com um passo de desnaturação de 3 min a 95°C, ao qual se seguem 36 ciclos constituídos por: desnaturação de 50 s a 94°C, emparelhamento de 50 s a 56°C, e extensão de 1 min a 72°C. Por último, fez-se extensão final de 10 min a 72°C. Os fragmentos resultantes da amplificação foram guardados a 4°C até terem sido aplicados no gel de eletroforese ou até terem sido enviados para sequenciação.

Os produtos de PCR foram sequenciados através de um serviço externo: STAB Vida. Os resultados recebidos foram posteriormente analisados, cuja sequência de nucleótidos foi alinhada através da base de dados GenBank da plataforma digital NCBI, utilizando a função Blast (*nucleotide blast*).

3.4.4.3. β -Tubulina

As tubulinas, em associação com outras proteínas, compõem os polímeros dinâmicos dos microtúbulos – que providenciam a base molecular para a segregação cromossómica, a divisão celular, a geração e manutenção da forma da célula, o transporte intracelular, e a motilidade celular por movimentos flagelares-ciliares. As tubulinas formam uma família de proteínas constituídas por α (alfa)-, β (beta)-, γ (gama)-, δ (delta)-, ϵ (épsilon)-, ζ (zeta)-, e η (eta)-tubulinas. Destas variedades, as α - e β -tubulinas são as mais abundantes em células eucarióticas, uma vez que os seus heterodímeros são os constituintes primários dos microtúbulos, e encontram-se extraordinariamente conservadas, especialmente no que diz respeito aos seus péptidos N-terminal. Em espécies ancestrais complexas, a diferença da sequência de DNA no gene da β -tubulina é cerca de 2,8% e não é evidente uma divergência na sequência de aminoácidos. Os genes das tubulinas, principalmente da β -tubulina, estão a receber cada vez mais atenção na investigação das relações evolucionais, uma vez que são encontrados em todos os eucariotas, o que faz com que este gene seja ideal para análise filogenética, adequando-se a estimativas de elevada similaridade filogenética e a análises de grupos de espécies complexos [70].

A reação de amplificação com o *primer* da β -tubulina foi executada para um volume final de 25 µL, contendo em cada amostra 20,6 µL de água RNase Free, 2,5 µL de tampão 10x *Dream Taq Buffer* com MgCl₂ 20 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,1 µL de *primer reverse* (Bt-2a 50 µM), 0,1 µL de *primer forward* (Bt-2b 50 µM), 0,2 µL de Taq

Metodologia

DNA polimerase 500 U e 1 µL de DNA fúngico extraído das amostras. Juntamente com estas amostras, foi também utilizado um branco, que funcionou como controlo.

A amplificação com o *primer* da β-tubulina iniciou-se com um passo de desnaturação de 5 min a 94°C, ao qual se seguem 40 ciclos constituídos por: desnaturação de 1 min a 94°C, emparelhamento de 1 min a 50°C, e extensão de 2 min a 72°C. Por último, fez-se extensão final de 6 min a 72°C. Os fragmentos resultantes da amplificação foram guardados a 4°C até terem sido aplicados no gel de eletroforese.

3.4.4.4. Análise do DNA amplificado

Para a realização da eletroforese, em primeiro lugar, procedeu-se à realização do gel de agarose 1%. As amostras foram aplicadas no gel, bem como o marcador de peso molecular 100 bp (NZYTech Ladder VII). Para a realização da eletroforese foi utilizada uma voltagem de 100 V, até ter sido percorrido cerca de 3/4 do gel. Finalmente, o gel foi revelado num transiluminador UV (Bio-rad).

3.4.4.5. Construção de dendogramas

Para a comparação do perfil de *fingerprinting* das amostras analisaram-se as diferentes bandas geradas após amplificação por M13-PCR e procedeu-se à elaboração de dendogramas através do programa Phoretix 1D Pro, para avaliação do grau de similaridade das amostras.

3.4.4.6. PCR em tempo real

A reação de amplificação em tempo real com o *primer* da β-tubulina foi executada PikoReal 96 (Thermo) com o PikoReal™ Software 2.2 para um volume final de 10 µL, contendo em cada amostra 9,6 µL de Master Mix (kit PerfeCTa® SYBR® Green Supermix, Quanta BioSciences, Inc, Gaithersburg), 0,05 µL de *primer reverse* (Bt-2a 50 µM), 0,05 µL de *primer forward* (Bt-2b 50 µM) e 0,4 µL de DNA fúngico extraído das amostras. Juntamente com estas amostras, foi também utilizado um branco, que funcionou como controlo.

Metodologia



Figura 19 - Termociclador e placa utilizados para a reação de PCR em Tempo Real

A amplificação em tempo real com os *primers* da β -tubulina (Tabela 1, Bt-2a e Bt-2b) iniciou-se com um passo de desnaturação de 7 min a 95°C, ao qual se seguem 40 ciclos constituídos por: desnaturação de 30 s a 95°C e emparelhamento/extensão de 30 s a 60°C. Por último, fez-se extensão final de 30 s a 60°C.

O ciclo de fluorescência (CF) e as unidades relativas de fluorescência (RFU) foram representados graficamente e utilizados para calcular a média de emissão de fluorescência de fundo nos ciclos iniciais. Os ciclos de PCR nos quais a fluorescência excedeu o limite foi definido como *Ct* (*Threshold cycle*). A quantificação absoluta foi realizada através da comparação dos valores de *Ct* das amostras desconhecidas com a curva padrão, realizando os cálculos adequados e considerando o valor inicial da concentração da amostra *Cladosporium halotolerans* (SA-5B) e as respectivas diluições decimais seriadas, que variaram entre 41 a 41×10^4 ng/mL. A concentração dos genes alvo dos isolados fúngicos foi expressa como a quantidade específica de DNA presente em cada amostra (ng/mL).

4. Resultados e Discussão



Resultados e Discussão

Para a realização deste trabalho foram selecionados 48 isolados fúngicos, recolhidos de vários bens patrimoniais com evidentes sinais de alteração, efetuando-se a sua caracterização através de uma abordagem polifásica que englobou a observação morfológica e a análise dos perfis moleculares e espectrais.

4.1. Locais de recolha dos isolados fúngicos

Os diversos microrganismos em estudo são provenientes de bens patrimoniais distintos, tais como, pintura mural, materiais pétreos, documentos escritos, peças em marfim e talha dourada.

Os murais das Casas Pintadas (Évora) - local pertencente desde 1962 à Fundação Eugénio de Almeida - são um dos exemplos mais icónicos de pinturas murais em Portugal durante a primeira metade do século XVI. Este conjunto de pinturas murais, presentes no exterior de um alpendre (e, consequentemente, estando exposto aos vários fatores climáticos) foi alvo de uma intervenção de conservação e restauro em 2013 [89].

Dos vários isolados fúngicos recolhidos a partir destas pinturas, foram selecionados 4, representados na figura 20.

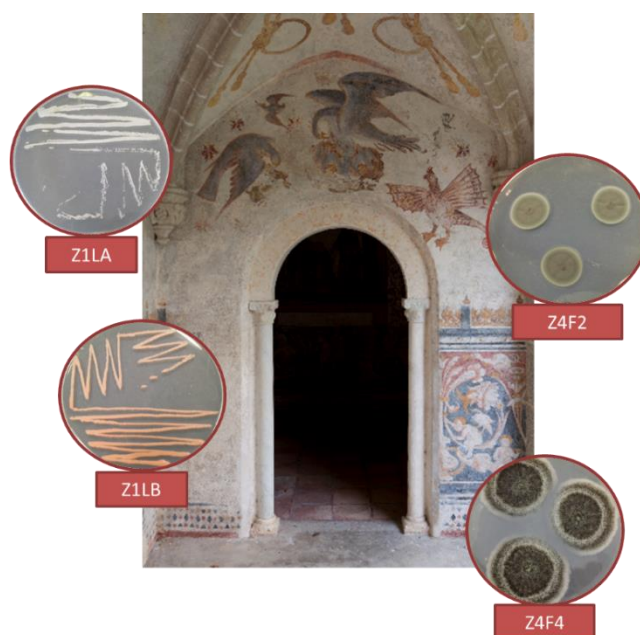


Figura 20 – Isolados fúngicos provenientes das pinturas murais das Casas Pintadas, Évora

A Igreja de Santa Clara foi construída no final do século XVI no Sabugueiro (Arraiolos), contém no seu interior uma nave coberta com pinturas murais (18 painéis) de cariz religioso. Estas pinturas apresentam danos estruturais e estéticos, sendo de destacar o enegrecimento de algumas figuras, principalmente as que foram efetuadas

Resultados e Discussão

com branco e vermelho de chumbo [90]. Esta igreja foi classificada como Monumento de Interesse Público em 2001.

Para este trabalho foram utilizados 5 isolados fúngicos recolhidos deste monumento, como se pode observar na figura 21.

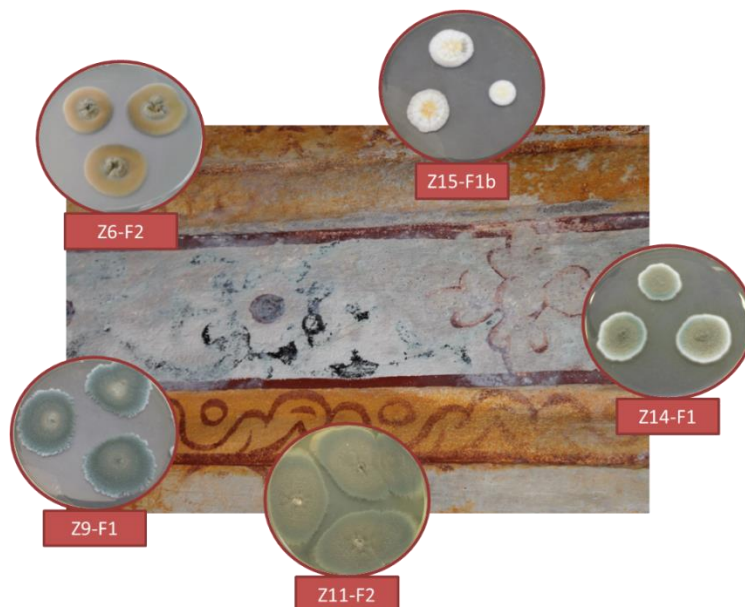


Figura 21 - Isolados fúngicos provenientes das pinturas murais da Igreja de Santa Clara, Arraiolos

A Igreja de Santo Aleixo é um edifício abandonado (há mais de 40 anos) que se encontra numa zona rural, perto de Montemor-o-Novo, e que tem sofrido vários danos estruturais, incluindo a queda parcial do teto, o aparecimento de fendas e sujeita a diversos atos de vandalismo. Esta igreja é um edifício do século XVI, com uma estrutura simples e que contém pinturas murais Renascentistas, representando a vida de Santo Aleixo. Como o edifício se encontra em condições de ambiente exterior há vários anos, apresenta um avançado estado de degradação, onde é possível identificar uma vasta contaminação biológica como principal responsável pela degradação e destacamento das camadas cromáticas, bem como fragmentos de argamassa [58, 91].

Dos 53 isolados fúngicos presentes nestas pinturas, foram selecionados 4 que estão representados na figura 22.

Resultados e Discussão



Figura 22 - Isolados fúngicos provenientes da Igreja de Santo Aleixo, Montemor-o-Novo

O já extinto Convento de Nossa Senhora da Saudação, fundado durante o reinado de D. Manuel I no interior do castelo medieval de Montemor-o-Novo, contém um conjunto de pinturas murais que são consideradas das mais importantes do primeiro quarto do século XVII na zona de Évora. Estas pinturas são atribuídas a José de Escovar e são compostas por 17 cenas pintadas, de cariz religioso. Como estas pinturas estão sujeitas a ambientes extremamente húmidos e reduzida luminosidade, a camada cromática sofreu severas alterações, sobretudo nas áreas verdes, onde se encontram densos biofilmes [92].

Para este trabalho foram utilizados 7 isolados fúngicos presentes nestas pinturas murais, tal como se pode observar na figura 23.

Resultados e Discussão



Figura 23 - Isolados fúngicos provenientes das pinturas murais do Convento de Nossa Senhora da Saudação, Montemor-o-Novo

Outro dos bens culturais de onde foram utilizados isolados fúngicos foram peças de marfim pertencentes ao espólio do Museu Nacional de Arte Antiga.

Para a realização deste trabalho foram selecionados 4 isolados fúngicos (Figura 24).

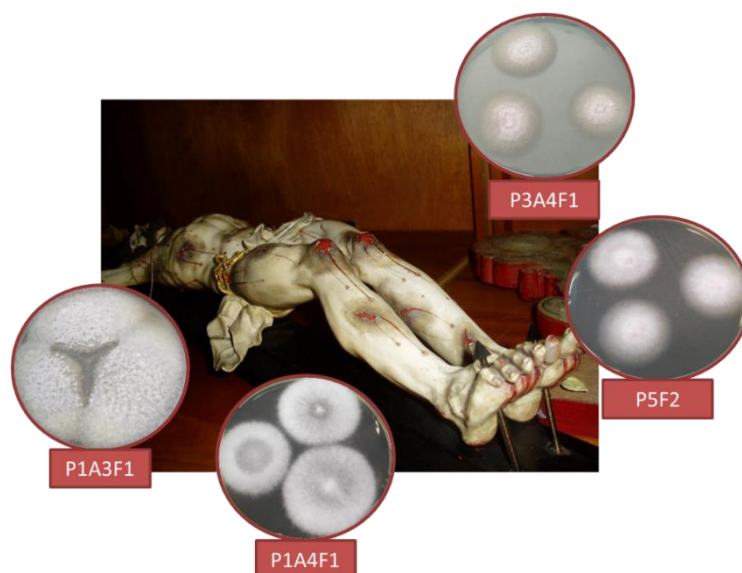


Figura 24 - Isolados fúngicos provenientes de peças de marfim

A Sé Catedral de Évora é a maior Catedral portuguesa e foi construída no estilo Gótico-Românico, no século XIII, tendo sido inspirada no modelo da Sé Catedral de

Resultados e Discussão

Lisboa e de outras internacionais. Este monumento já foi alvo de várias intervenções de conservação e restauro [93].

Foram recolhidos vários microrganismos das zonas pétreas da Sé Catedral de Évora, e apesar de todos estarem associados à biodeterioração deste monumento, é de destacar o isolado CPIL1 que, apesar de não ser o único, é o que está mais fortemente relacionado com o aparecimento de manchas cor-de-rosa na parede do edifício [93]. Na figura 25 é possível observar-se os 7 isolados fúngicos utilizados neste trabalho.

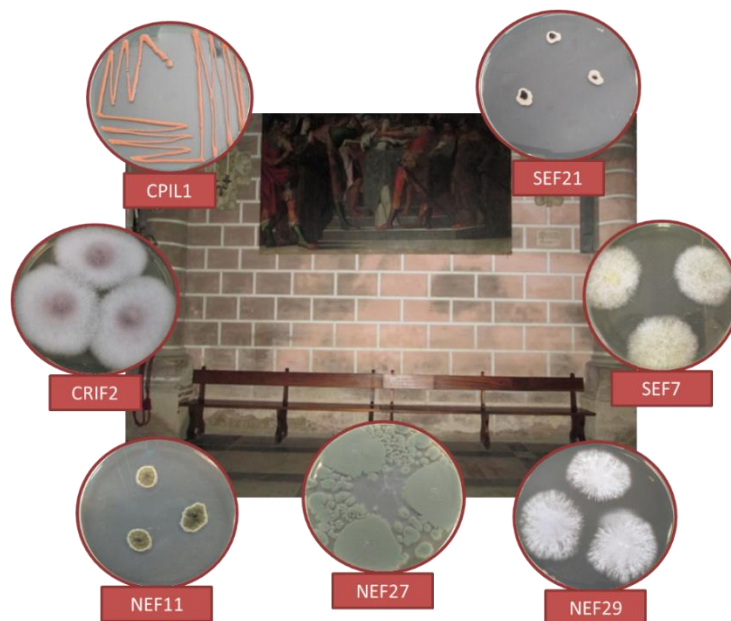


Figura 25 - Isolados fúngicos provenientes de umas das paredes de pedra da Sé Catedral de Évora

A Igreja do Espírito Santo (Évora) está ligada à fundação do Colégio do Espírito Santo, da Companhia de Jesus, e foi concluída em 1572. Contém uma única nave, em cruz latina, e dez capelas laterais, onde é possível encontrar luxuosas incrustações em talha dourada.

A população fúngica foi encontrada em áreas com elevado grau de alteração, principalmente no que diz respeito à desintegração/desorganização das fibras da madeira. Todos os isolados fúngicos apresentavam atividade celulolítica e xilanolítica, apesar dos níveis destas variarem consoante o microrganismo [94]. Na figura 26 é possível observar os 7 isolados fúngicos utilizados neste trabalho.

Resultados e Discussão



Figura 26 - Isolados fúngicos provenientes da talha dourada da Igreja do Colégio do Espírito Santo, Évora

Para a realização deste trabalho foram ainda selecionados dois documentos: um em pergaminho, o Foral de Alvito (1280), e um em papel, o Livro da Inquisição de Lisboa (1589–1592). Estes documentos pertencem ao Arquivo Nacional Português, situado na Torre do Tombo, em Lisboa, e têm estado armazenados com condições ambientais controladas, providenciadas pela instituição. Apesar disso, estes documentos apresentavam fortes sinais de contaminação microbiológica, essencialmente manchas acastanhadas [95].

Dos isolados fúngicos encontrados nestes dois documentos, foram selecionados 10, que se encontram na figura 27.

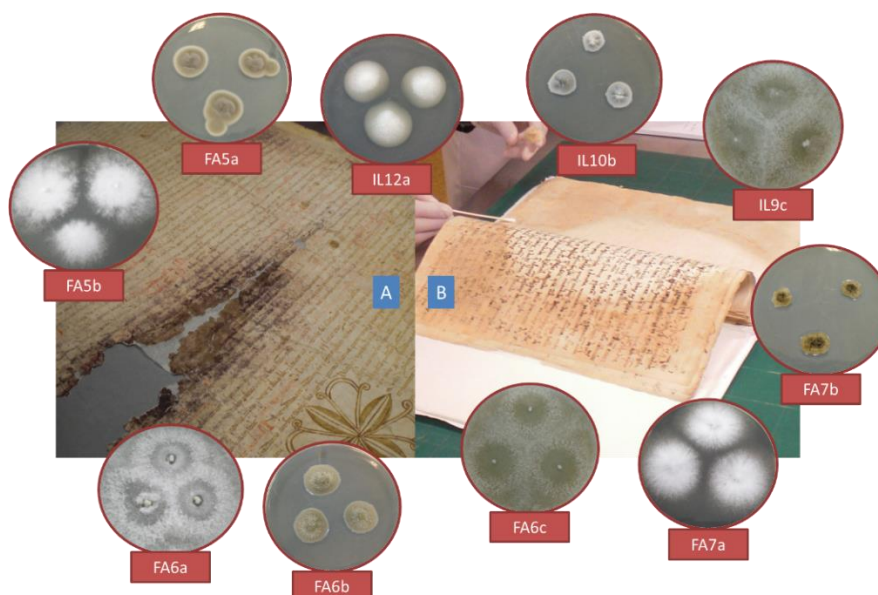


Figura 27 - Isolados fúngicos provenientes de documentos pertencentes ao espólio da Torre do Tombo: Foral de Alvito (A) e Livro da Inquisição de Lisboa (B).

A primeira abordagem para a caracterização dos diversos isolados microbiológicos em estudo baseou-se nas suas características morfológicas.




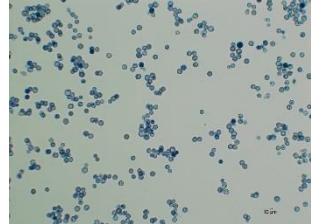
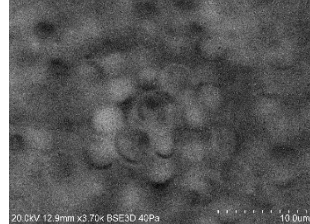


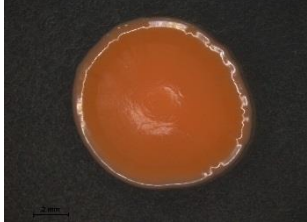
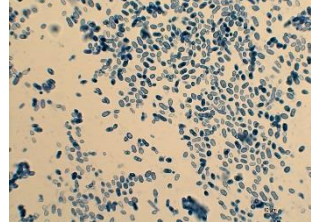
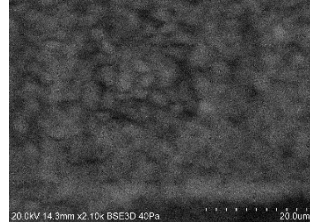




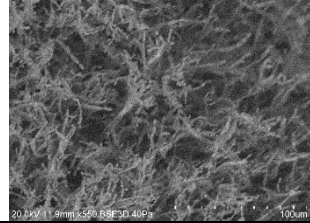




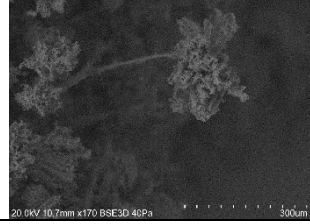
4.2. Caracterização Morfológica

Os isolados fúngicos foram observados à vista desarmada, com a lupa binocular, com o microscópio ótico e através de microscopia eletrónica de varrimento, apenas no meio MEA, ao fim de 6-7 dias. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Através da observação das características macro e micro morfológicas foi feita uma primeira identificação dos isolados fúngicos (Tabela 2), sendo que os principais parâmetros tidos em conta foram as estruturas reprodutoras observáveis microscopicamente e o aspeto macroscópico das colónias. Foram atribuídos números diferentes quando o aspeto macroscópico era diferente, e foram designados por micélios os isolados fúngicos para os quais não foi possível identificar as estruturas reprodutoras.





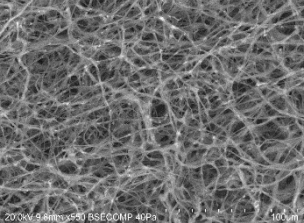




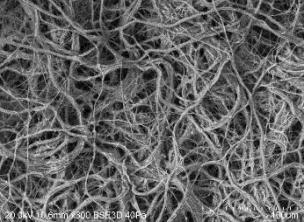




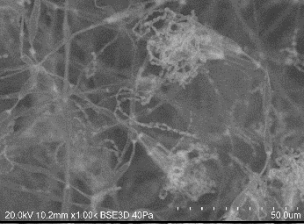


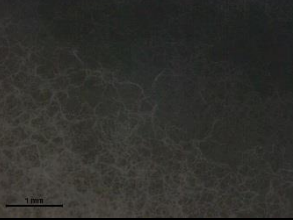

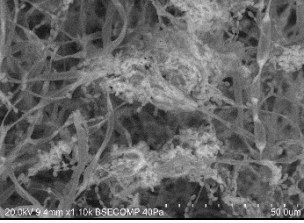
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Pintura Mural - Casas Pintadas	Z1-LA						Levedura 1
	Z1-LB						Levedura 2
	Z4-F2						Cladosporium sp.1
	Z4F4						Aspergillus sp.1








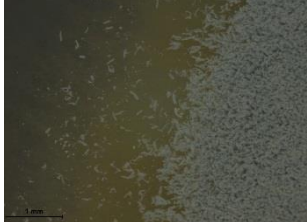

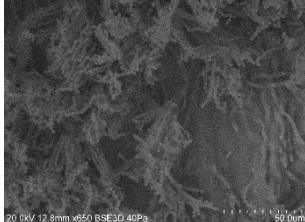




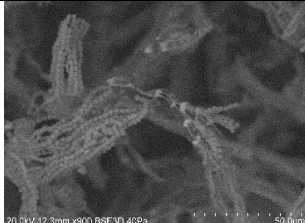




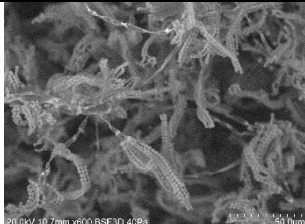
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Marfim	P1A3F1						Micélio 1
	P1A4F1						Micélio 2
	P3A4F1						<i>Penicillium</i> sp.1
	P5F2						<i>Penicillium</i> sp.2



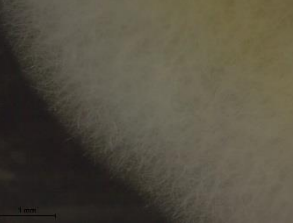

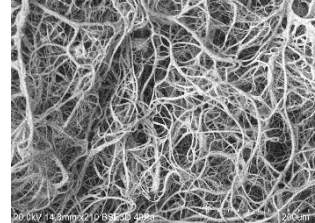




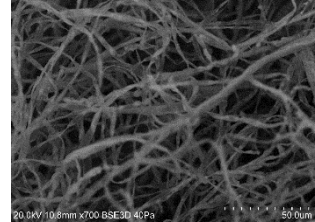

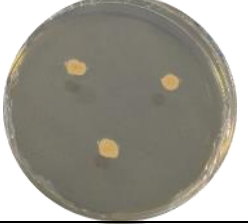
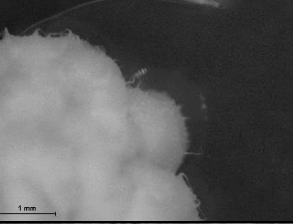

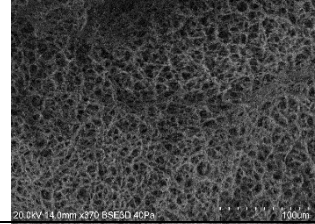



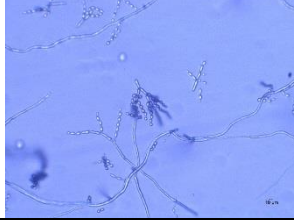
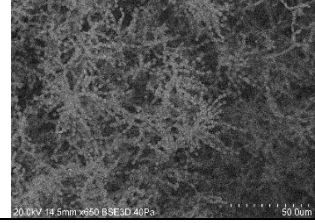
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Pintura Mural – Igreja de Santa Clara	Z6-F2						<i>Cladosporium</i> sp.2
	Z9-F1						<i>Penicillium</i> sp.3
	Z11-F2						<i>Penicillium</i> sp.4
	Z14-F1						<i>Penicillium</i> sp.5



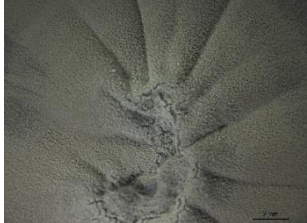

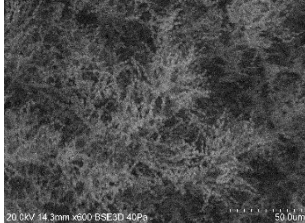




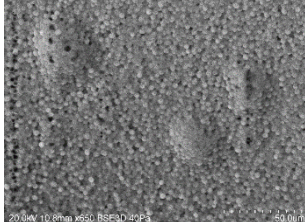



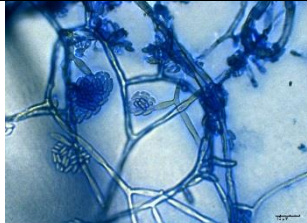
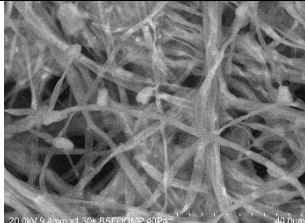


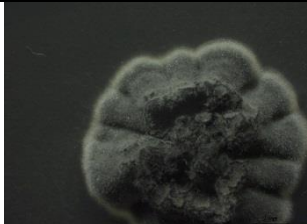
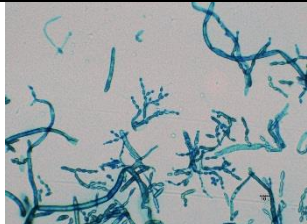
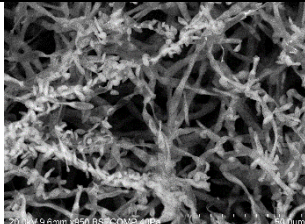
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Pintura Mural – Igreja de Santo Aleixo	Z15-F1b						Micélio 3
	SA-3C						Micélio 4
	SA-3F						Micélio 5
	SA-5D						<i>Cladosporium</i> sp.3



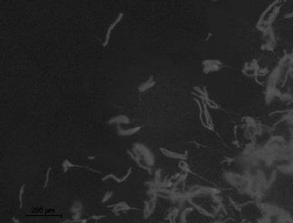
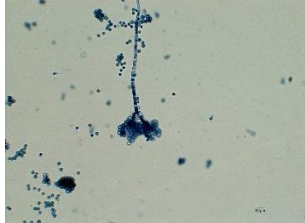
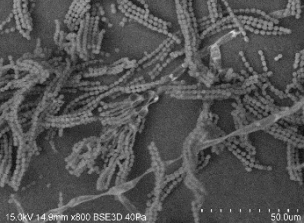



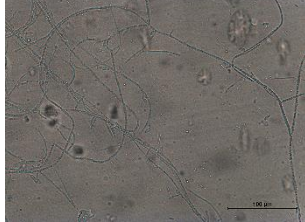
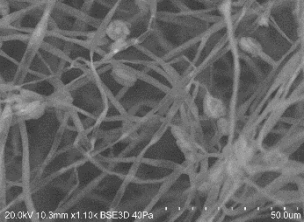




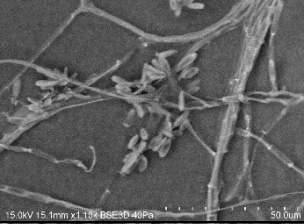

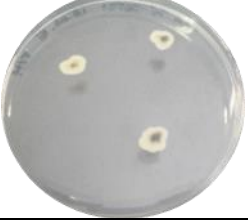
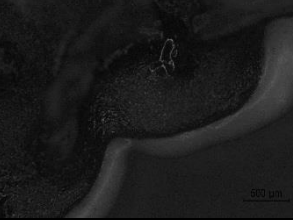
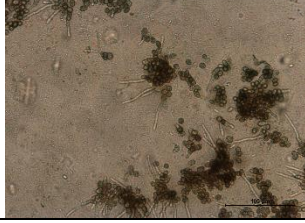
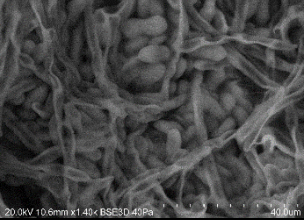
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Pedra – Sé de Évora	SA-5E						<i>Cladosporium</i> sp.4
	CPIL1						<i>Rhodotorula</i> sp.1
	CRIF2						Micélio 6
	NEF11						<i>Cladosporium</i> sp.5










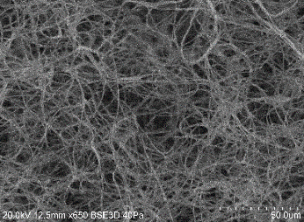




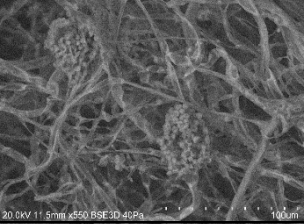

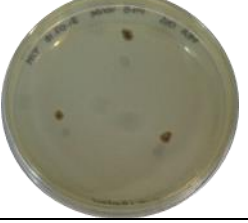

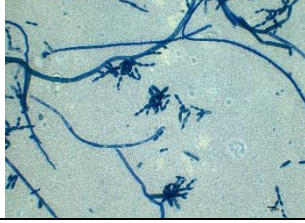

Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Pedra – Sé de Évora	NEF27						<i>Penicillium</i> sp.6
	NEF29						<i>Fusarium</i> sp.1
	SEF7						<i>Fusarium</i> sp.2
	SEF21						Micélio 7




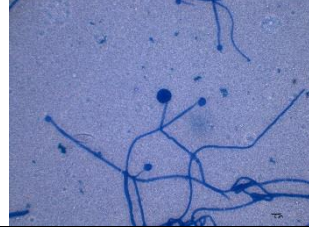
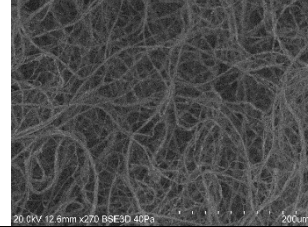
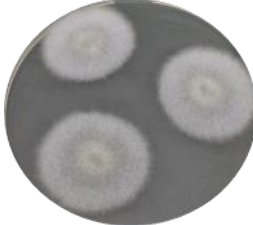

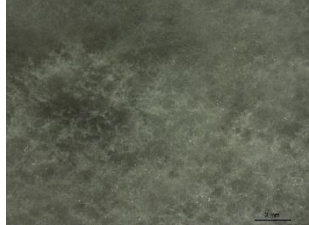

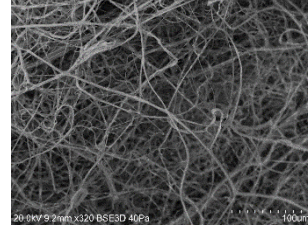
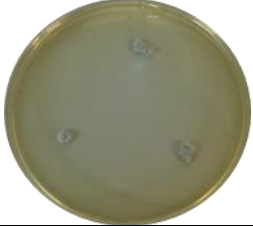
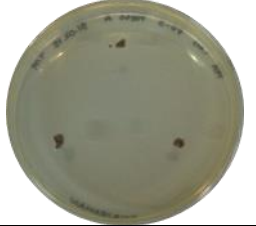


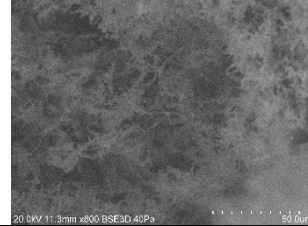


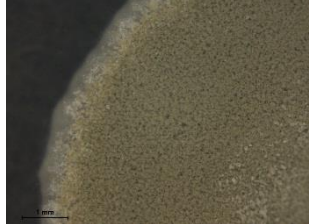
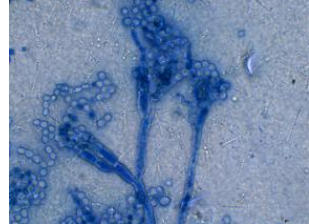
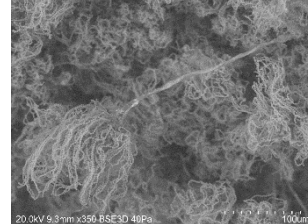
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Pintura Mural – Convento de Nossa Sra. Da Saudação	P2-1						<i>Cladosporium</i> sp.6
	P2-2A						Micélio 8
	P2-3						<i>Aspergillus</i> sp.2
	P4-5 Verde						<i>Cladosporium</i> sp.7




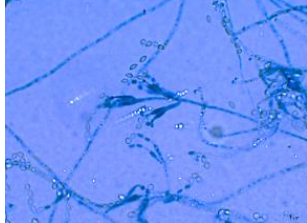
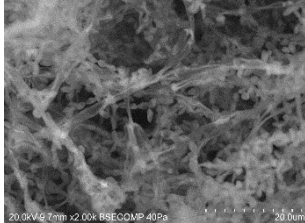

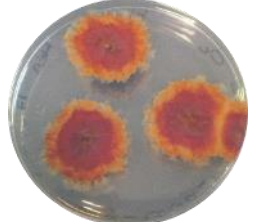

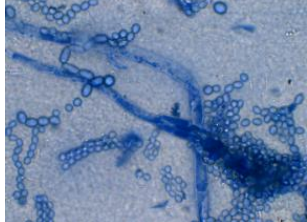
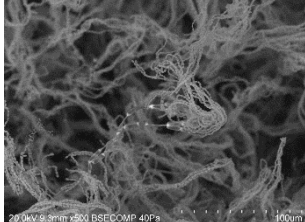
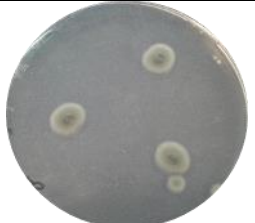







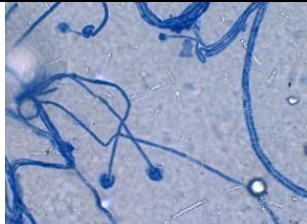
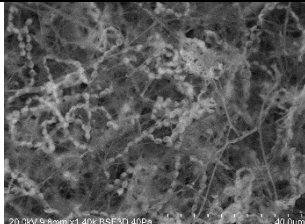
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Pintura Mural – Convento de Nossa Sra. Da Saudação	P5-2-A Ad. Org. A						Micélio 9
	P5-2-A Ad. Org. B						Micélio 10
	P5-3 Preto A						<i>Penicillium</i> sp.7
Altar 2 – Coluna B							<i>Penicillium</i> sp.8

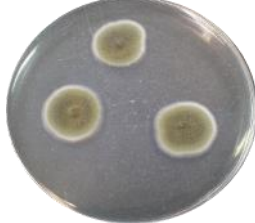



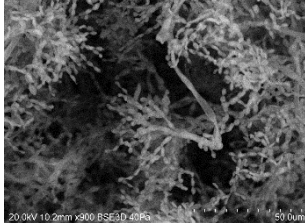


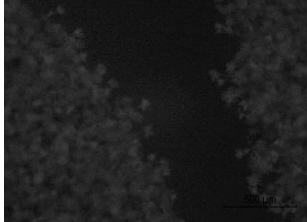
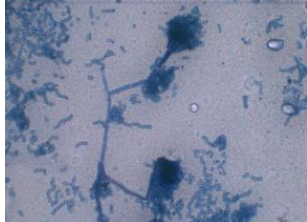
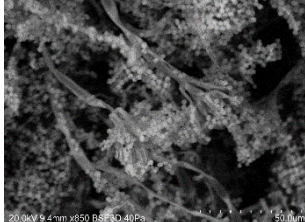




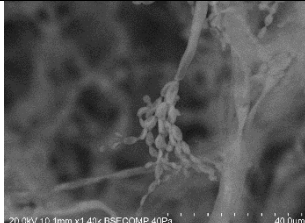



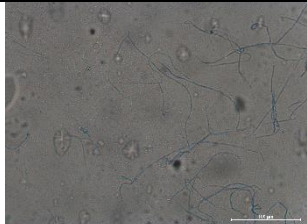
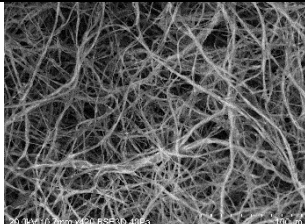
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Talha Dourada	Altar 2 – Coluna C						<i>Cladosporium</i> sp.8
	Altar 2 – Coluna F						<i>Penicillium</i> sp.9
	Altar 2 - D						<i>Cladosporium</i> sp.9
	Altar 2 - E						<i>Mucor</i> sp.1



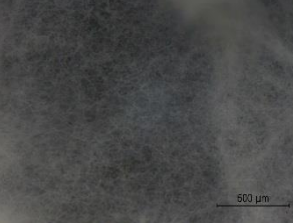
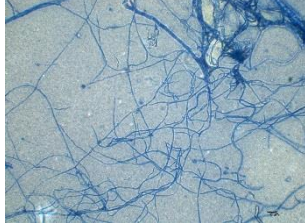
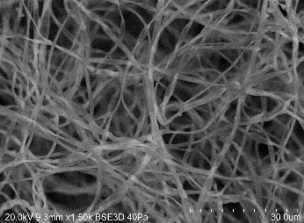



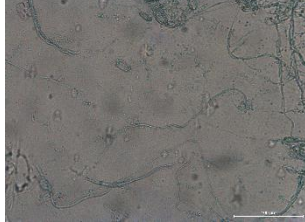
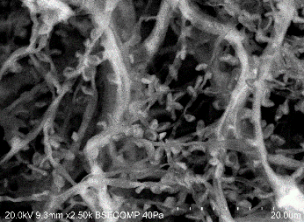


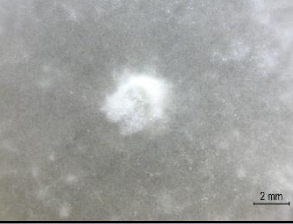
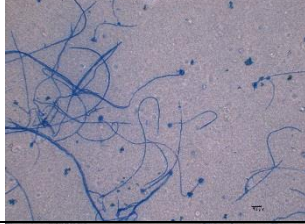
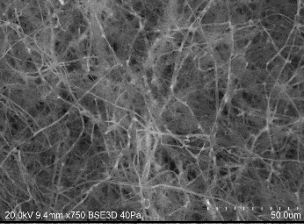


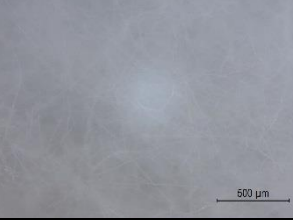
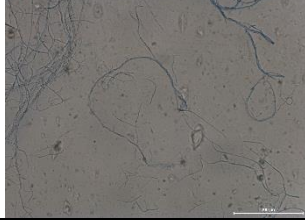
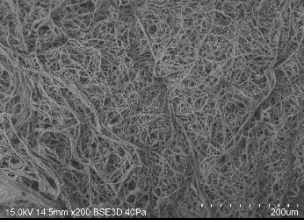
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Talha Dourada	Altar 2 - I						<i>Cladosporium</i> sp.10
	Altar 2 - K						<i>Penicillium</i> sp.10
Papel/Pergaminho	FA5a						<i>Cladosporium</i> sp.11
	FA5b						Micélio 11










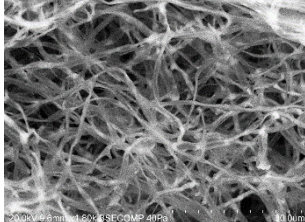


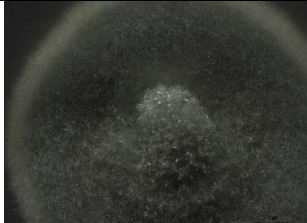

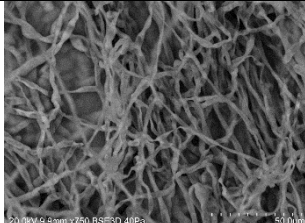


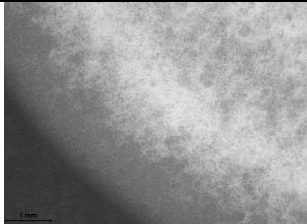
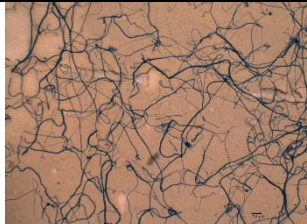
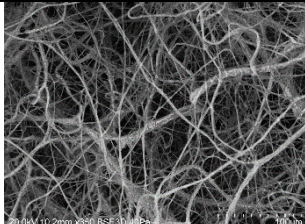
Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Papel/Pergaminho	FA6a						Micélio 12
	FA6b						Micélio 13
	FA6c						Micélio 14
	FA7a						Micélio 15

Resultados e Discussão

Tabela 2 - Caracterização macro e micromorfológica dos isolados fúngicos, em MEA, durante 3 dias (leveduras) e 7 dias (fungos). (continuação)

	Código	Observação Macroscópica		Observação à Lupa Binocular	Observação Microscópica		Identificação provisória
		Frente	Verso		Microscopia Ótica	MEV	
Papel/Pergaminho	FA7b						<i>Cladosporium</i> sp.12
	IL9c						Micélio 16
	IL10b						Micélio 17
	IL12a						Micélio 18

Resultados e Discussão

Analisando a Tabela 2, é possível ver que, no caso das pinturas murais, os fungos mais comuns pertencem gêneros *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*, o que está de acordo com a bibliografia [9]. No caso dos edifícios construídos em pedra, são de destacar os isolados fúngicos do gênero *Fusarium*, que tal como referido na literatura são comuns neste tipo de material. No entanto, também são comumente encontrados fungos dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus* [53]. Nas peças de marfim, é o gênero *Penicillium* que se destaca neste trabalho, mas devido à escassez de estudos sobre biodegradação/biodeterioração em marfim, não é possível comparar estes dados com pesquisas anteriores. No altar de talha dourada, são de destacar os gêneros *Penicillium* e *Cladosporium*, o que está em conformidade com a bibliografia consultada, que refere que a subdivisão Ascomycota como associada a alterações em bens patrimoniais efetuados em madeira [94].

Neste estudo, para além da análise de todos os isolados fúngicos por microscopia eletrónica de varrimento (MEV) que permitiu a observação da morfologia de cada um deles, foi também efetuada a análise com MEV-EDS, onde se identificou a composição elementar, dos diversos isolados, sendo os constituintes maioritários carbono, azoto, oxigénio e enxofre, cuja combinação é indicativa da presença de material orgânico que pode ser relacionado com a existência de contaminação microbiológica (como exemplo apresenta-se um espectro na figura 46, no anexo F). Contudo, esta análise química não permite a discriminação dos microrganismos existentes, uma vez que a constituição elementar é similar entre eles.

No entanto, esta técnica é uma ferramenta muito útil, principalmente no que diz respeito à análise da biodegradação / biodeterioração em amostras reais (análise direta de microamostras), pois permite que se obtenham imagens com grande resolução e elevado poder de ampliação. Assim, é possível fazer uma identificação rápida da presença de contaminação microbiológica e distinção de certos microrganismos, graças à morfologia característica destes, sem que seja necessária cultura dos microrganismos em laboratório.

De forma a complementar a informação obtida, os isolados fúngicos foram inoculados em três meios de cultura diferentes (CYA, PDA e MEA). O desenvolvimento de cada cultura pura de isolado foi monitorizado ao longo de 14 dias, tendo sido pormenorizadamente analisados ao 3º, 5º, 7º, 10º e 14º dias, de forma a avaliar as suas características morfológicas. Esta abordagem pode fornecer informação mais detalhada sobre a morfologia dos microrganismos e através da análise de produção de exsudado, cor do micélio, estágio de desenvolvimento, discriminar características típicas.

Resultados e Discussão

Esta metodologia permite distinguir isolados fúngicos apresentem ter morfologia idêntica quando cultivados apenas em MEA, mas que, apresentem características macroscópicas diferentes noutros meios de cultura, designadamente PDA e CYA.

Nas tabelas 3-10 são apresentadas imagens representativas de culturas de fungos filamentosos com 7 dias de incubação e leveduras com 3 dias de desenvolvimento, agrupadas por casos de estudo. Nestas tabelas é possível observar as características dos vários isolados fúngicos nos diferentes meios seletivos. Estas características encontram-se compiladas na tabela 15 do anexo G.

A tabela 3 refere-se aos isolados fúngicos encontrados nas pinturas murais presentes nas Casas Pintadas, em Évora. Na tabela 4, são apresentados os isolados fúngicos encontrados em peças de marfim. O isolado fúngico P5F2 apresenta um aspeto macroscópico muito semelhante ao isolado P3A4F1 pelo que, inicialmente, se pensou que se tratava do mesmo isolado fúngico, no entanto são perceptíveis diferenças entre os dois isolados fúngicos, principalmente no meio PDA.

O aspeto macroscópico dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais da Igreja de Santa Clara, em diferentes meios de cultura são apresentados na tabela 5.

Na tabela 6, observam-se os isolados fúngicos encontrados nas pinturas murais da Igreja de Santo Aleixo.

Na tabela 7, apresentam-se os isolados fúngicos presentes na Sé de Évora (pedra). Inicialmente, pensou-se que os isolados fúngicos NEF29 e SEF7 poderiam ser da mesma espécie, mas há diferenças evidentes entre eles, principalmente no meio de cultura CYA.

A tabela 8 refere-se aos isolados fúngicos encontrados nas pinturas murais do Convento de Nossa Senhora da Saudação.

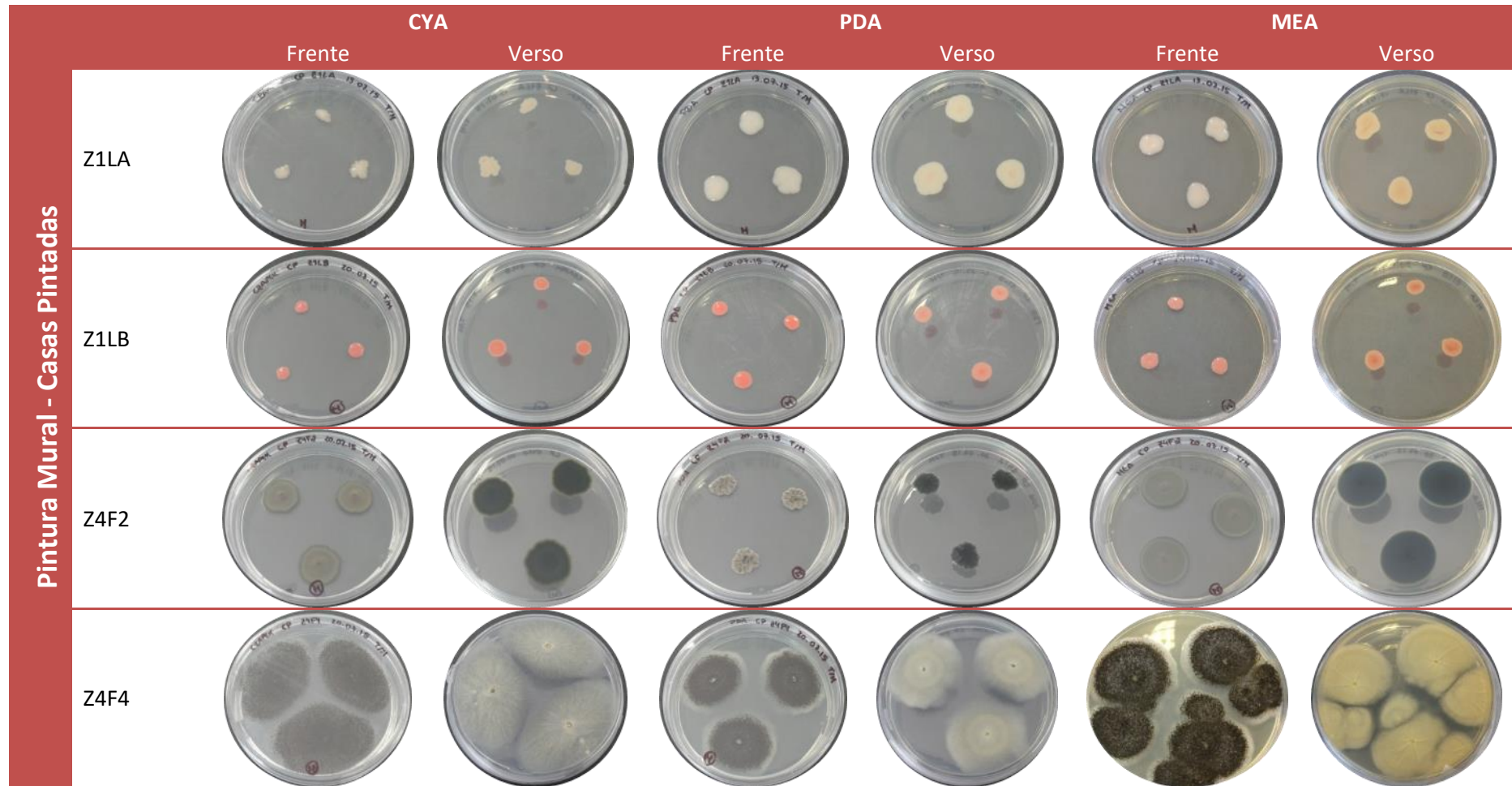
Os isolados fúngicos encontrados no altar de talha dourada da Igreja do Espírito Santo (Évora) são apresentados na tabela 9.

A tabela 10 diz respeito aos isolados fúngicos encontrados nos documentos de papel e pergaminho preservados na Torre do Tombo (Lisboa). Os isolados fúngicos FA6a, FA6c e IL9c apresentam diferenças macroscópicas nas culturas em MEA, parecendo tratar-se de estirpes diferentes. No entanto, os outros isolados fúngicos apresentaram características semelhantes em todos os meios de cultura utilizados.

O aspeto macroscópico em diferentes meios de cultura conjuntamente com a análise microscópica permite a diferenciação dos diferentes isolados

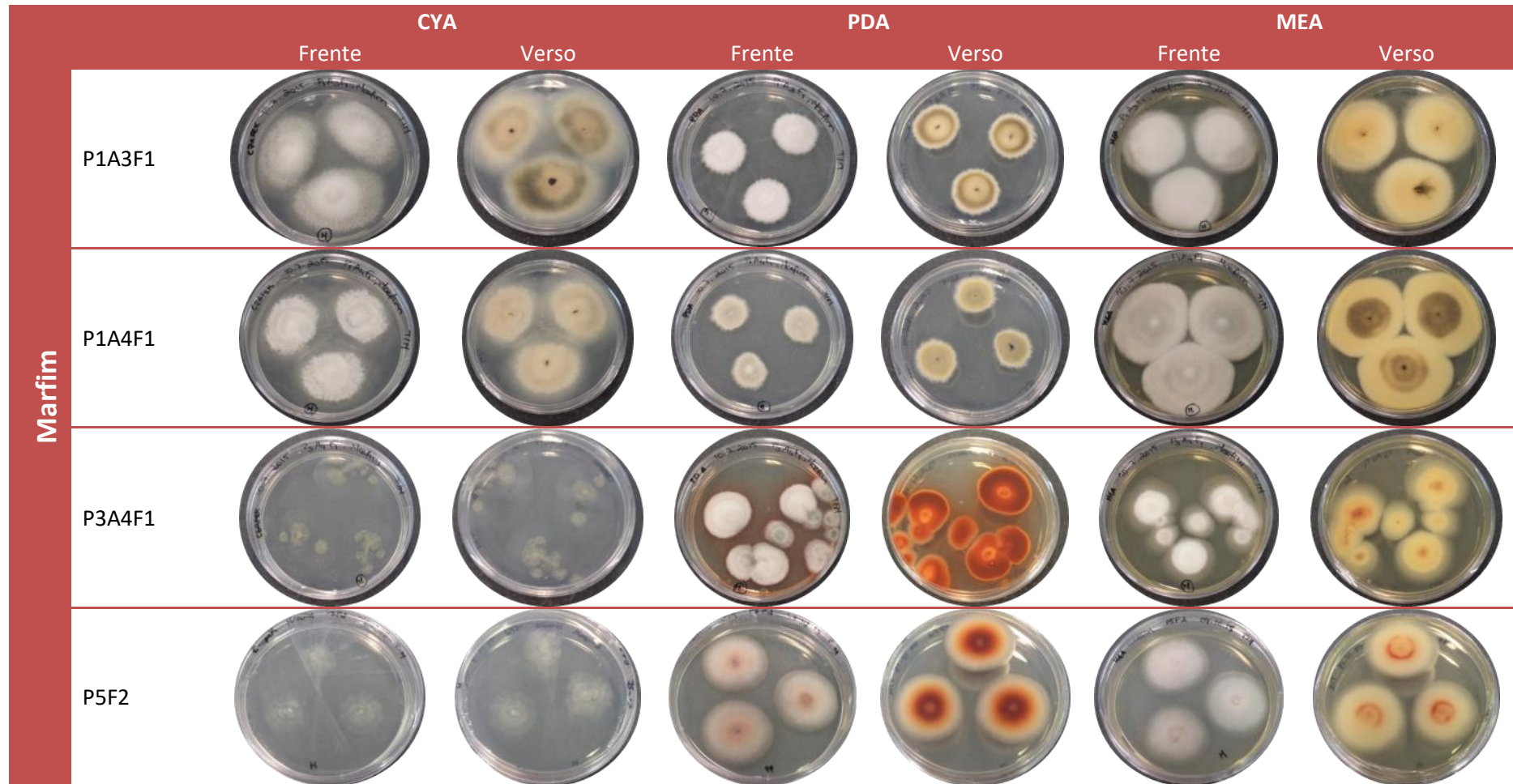
Resultados e Discussão

Tabela 3 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais das Casas Pintadas, Évora (incubação de 7 dias para os fungos filamentosos e 3 dias para as leveduras).






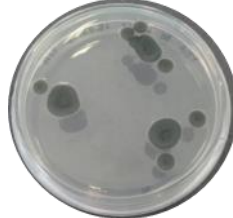




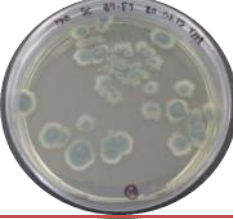















Resultados e Discussão

Tabela 4 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em peças de marfim (incubação de 7 dias).



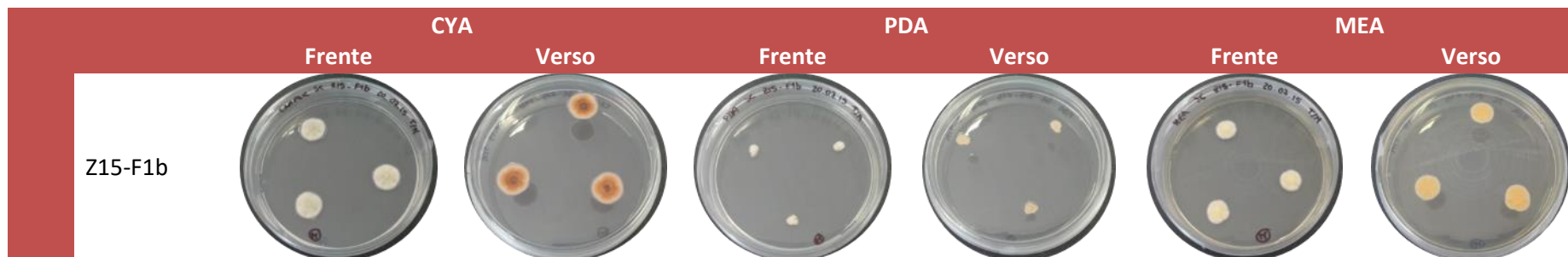
Resultados e Discussão

Tabela 5 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais da Igreja de Santa Clara, Arraiolos (incubação de 7 dias).

Pintura Mural - Igreja de Santa Clara	CYA		PDA		MEA	
	Frente	Verso	Frente	Verso	Frente	Verso
						
						
						
						




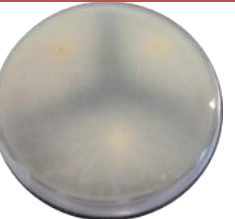








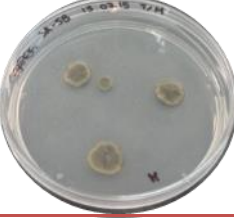
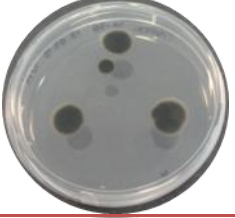
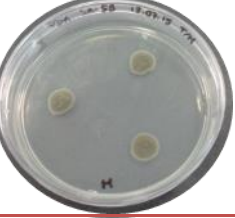
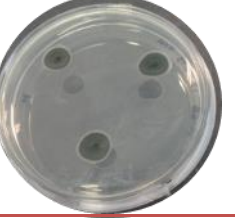

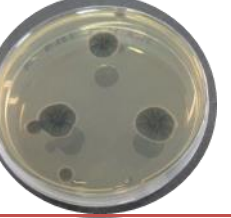



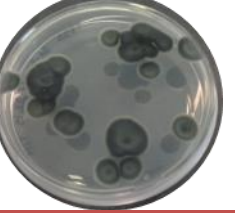

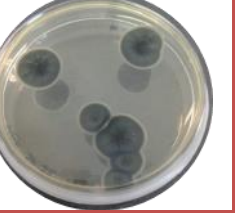
Resultados e Discussão

Tabela 5 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais da Igreja de Santa Clara, Arraiolos (incubação de 7 dias). (continuação)



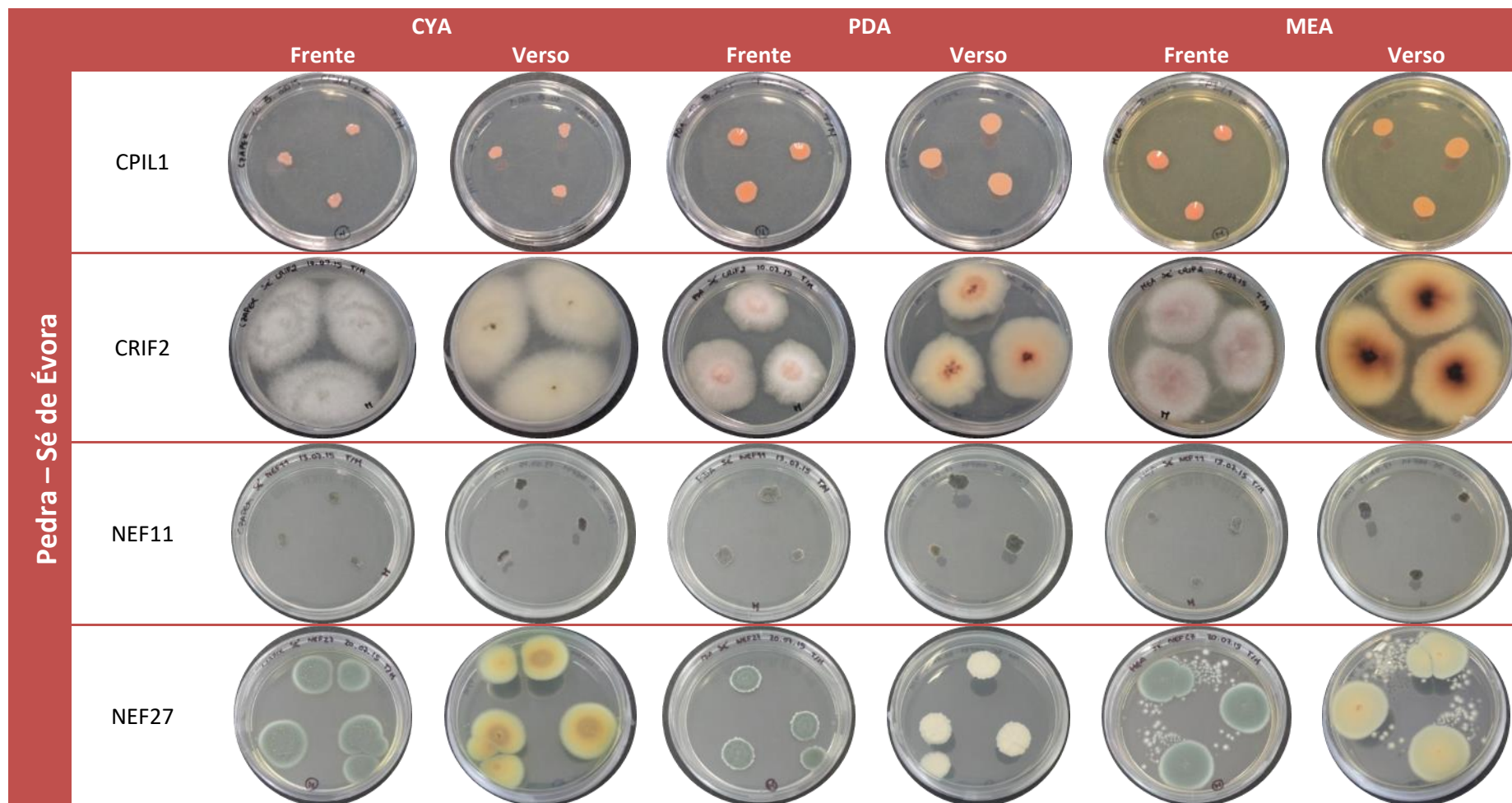
Resultados e Discussão

Tabela 6 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais da Igreja de Santo Aleixo, Montemor-o-Novo (incubação de 7 dias).

		CYA		PDA		MEA	
		Frente	Verso	Frente	Verso	Frente	Verso
Pintura Mural – Igreja de Santo Aleixo	SA-3C						
	SA-3F						
	SA-5B						
	SA-5E						

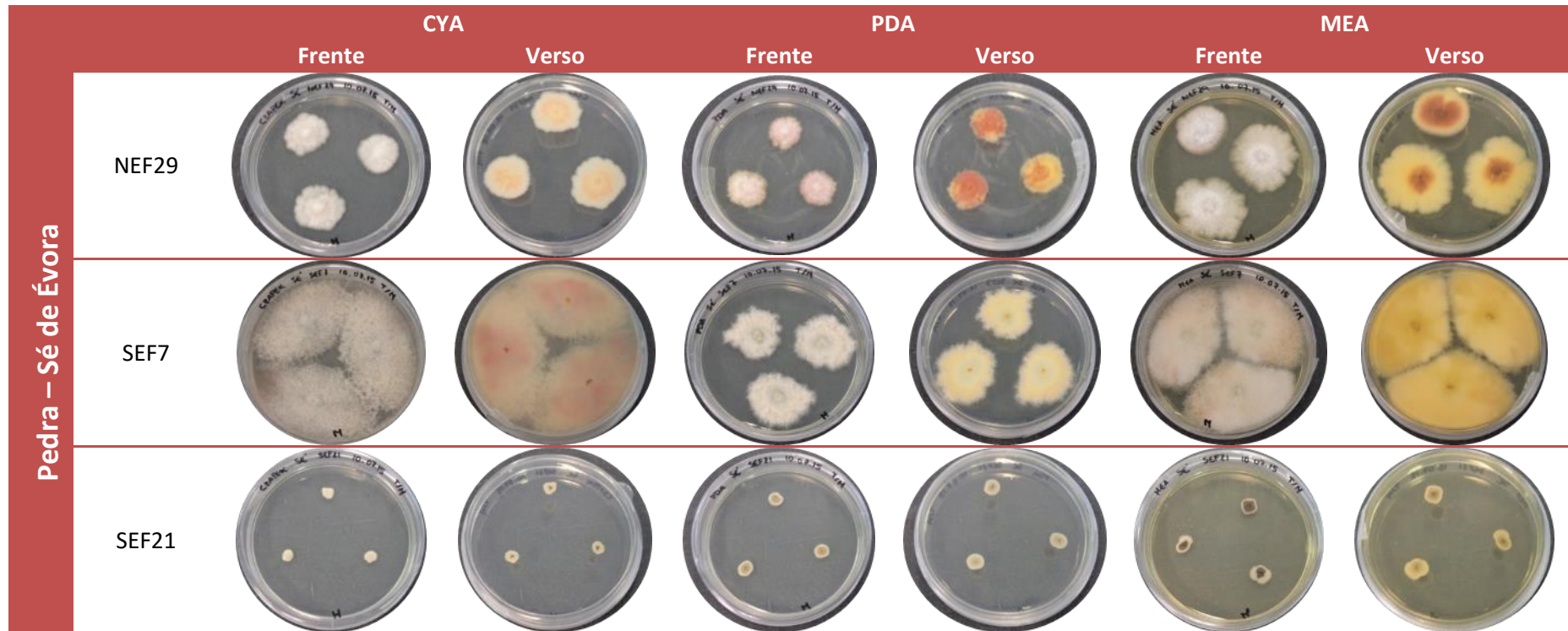
Resultados e Discussão

Tabela 7 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais de uma parede de pedra da Sé de Évora (incubação de 7 dias para os fungos filamentosos e 3 dias para as leveduras).






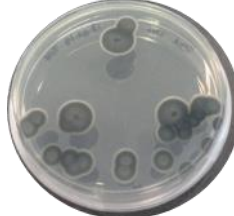

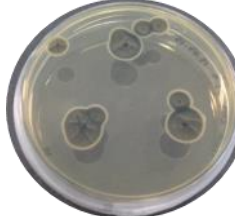



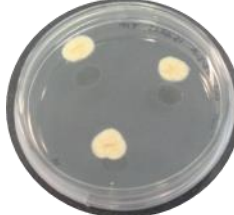



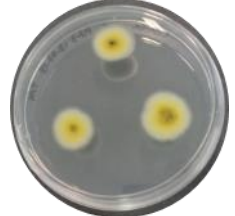

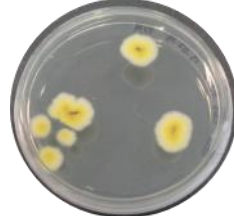



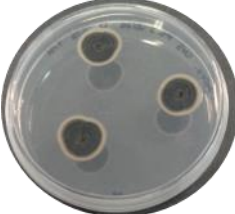
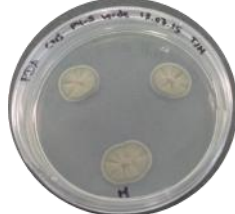
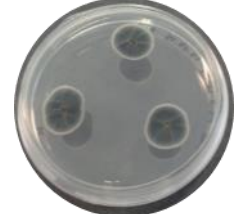

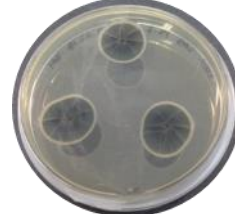
Resultados e Discussão

Tabela 7 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais de uma parede de pedra da Sé de Évora (incubação de 7 dias para os fungos filamentosos e 3 dias para as leveduras). (continuação)






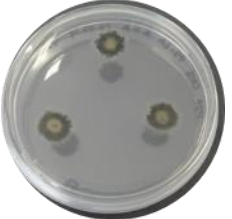




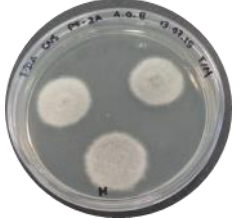


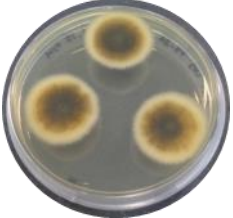

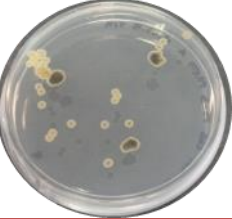

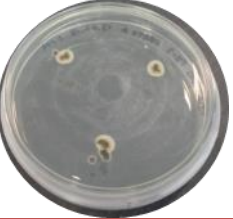

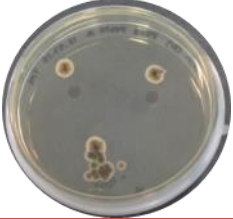
Resultados e Discussão

Tabela 8 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais do Convento de Nossa Senhora da Saudação, Montemor-o-Novo (incubação de 7 dias).

	CYA		PDA		MEA	
	Frente	Verso	Frente	Verso	Frente	Verso
P2-1						
P2-2A						
P2-3						
P4-5 verde						





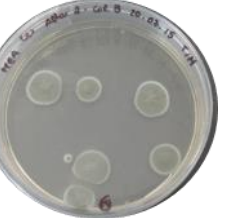


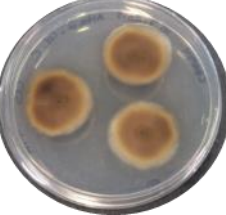

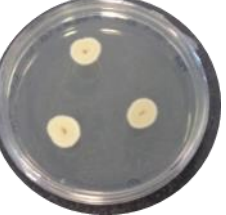


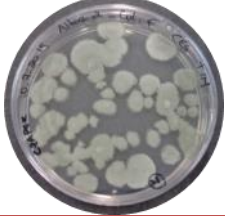
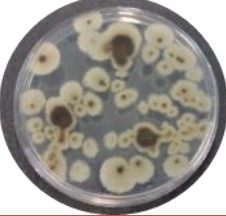


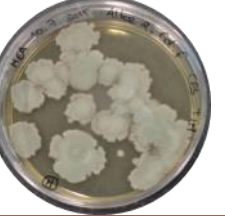




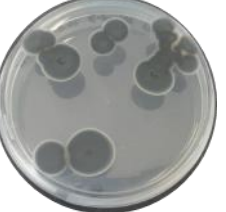


Resultados e Discussão

Tabela 8 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes nas pinturas murais do Convento de Nossa Senhora da Saudação, Montemor-o-Novo (incubação de 7 dias). (continuação)

Pintura Mural - Convento de N. Sra. da Saudação	CYA		PDA		MEA	
	Frente	Verso	Frente	Verso	Frente	Verso
						
						
P5-3 Preto A						

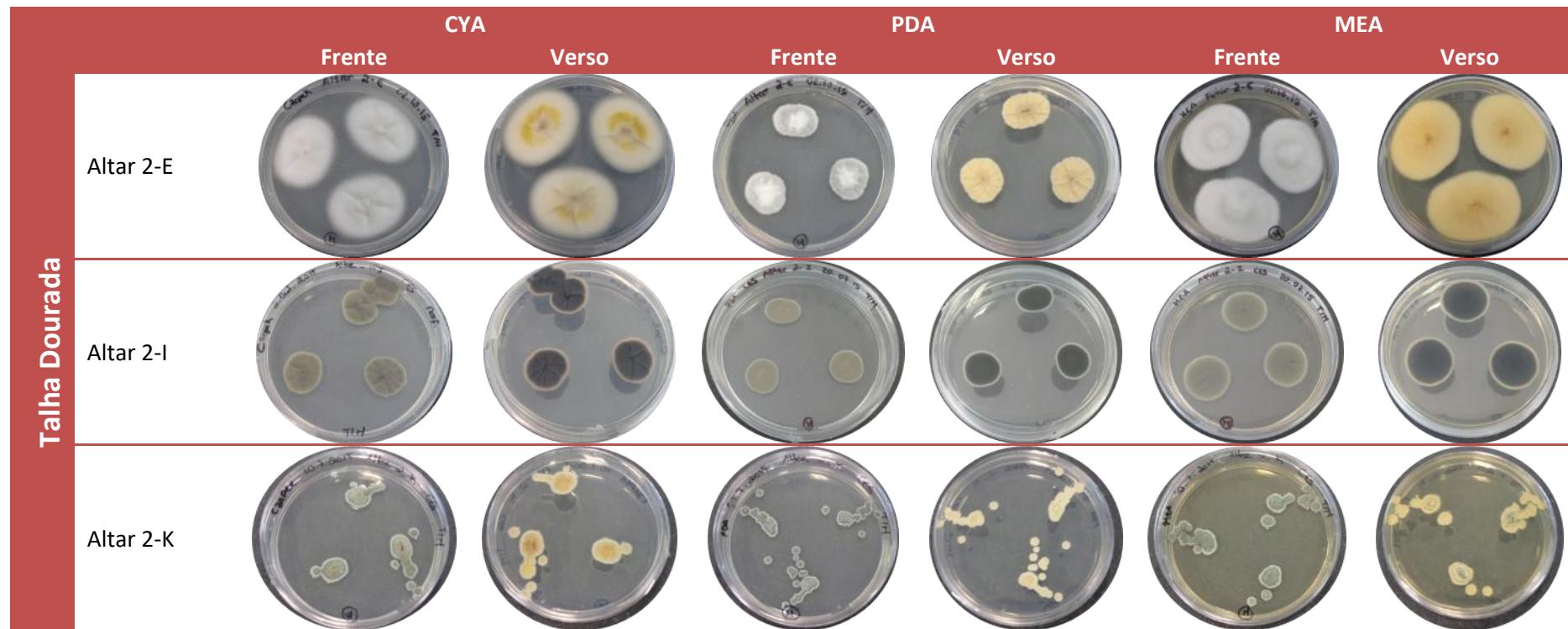
Resultados e Discussão

Tabela 9 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em talha dourada existente na Igreja do Colégio do Espírito Santo, Évora (incubação de 7 dias).

Talha Dourada	CYA		PDA		MEA	
	Frente	Verso	Frente	Verso	Frente	Verso
						
						
						
						










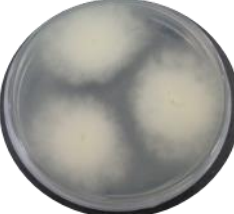









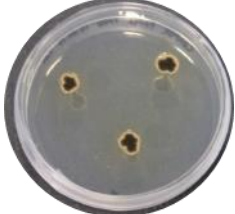

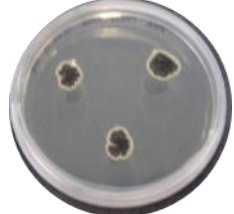

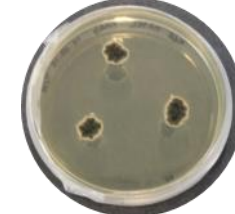
Resultados e Discussão

Tabela 9 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em talha dourada existente na Igreja do Colégio do Espírito Santo, Évora (incubação de 7 dias). (continuação)



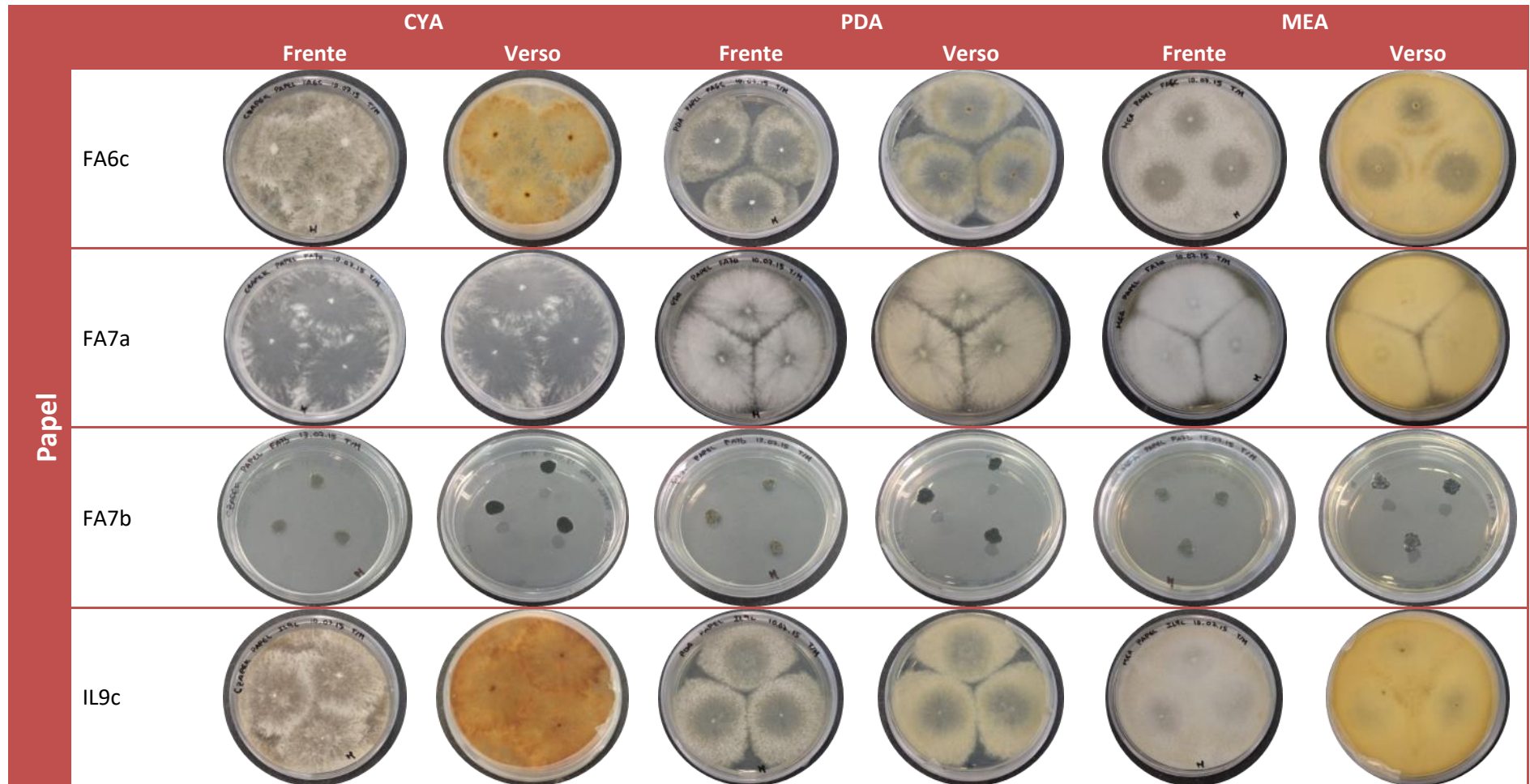
Resultados e Discussão

Tabela 10 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em documentos de papel e pergaminho do espólio da Torre do Tombo (incubação de 7 dias).

	CYA		PDA		MEA	
	Frente	Verso	Frente	Verso	Frente	Verso
Papel FA5a						
Papel FA5b						
Papel FA6a						
Papel FA6b						


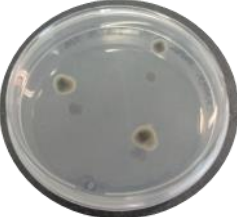


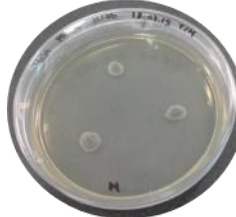
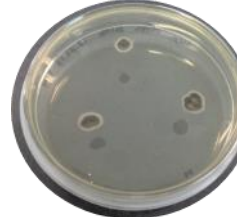



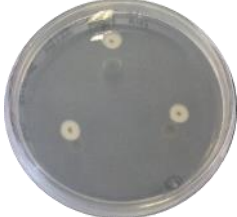


Resultados e Discussão

Tabela 10 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em documentos de papel e pergaminho do espólio da Torre do Tombo (incubação de 7 dias). (continuação)



Resultados e Discussão

Tabela 10 - Caracterização morfológica dos isolados fúngicos presentes em documentos de papel e pergaminho do espólio da Torre do Tombo (incubação de 7 dias). (continuação)

		CYA		PDA		MEA	
		Frente	Verso	Frente	Verso	Frente	Verso
Papel	IL10b						
	IL12a						

Resultados e Discussão

A identificação macro- e microscópica permitiu distinguir os isolados fúngicos e identificar o gênero/espécie quando apresentam estruturas reprodutoras (Tabela 2), no entanto, a análise macromorfológica em vários meios de cultura permite caracterizar isolados com características distintas (Tabela 3-10). Foi o caso dos isolados fúngicos: P3A4F1 e P5F2; Z11-F2 e Z14-F1 (*Penicillium* sp.); NEF29 e SEF7 (*Fusarium* sp.); e P5-2A Ad. Org. A e P5-2A Ad. Org. B (ambos designados por micélio por não ter sido possível identificar as estruturas reprodutoras).

As técnicas dependentes de cultura representam uma mais-valia para estudos de biodegradação, devido à grande diversidade de isolados, permitindo obter elevada concentração de células em cultura e possibilitando a realização de testes de simulação ou de mitigação, de estudos metabólicos e também estudos de análise molecular a partir de DNA e/ou RNA dos isolados, permitindo uma caracterização polifásica para identificação dos isolados. No entanto, os métodos cultura-dependentes apresentam algumas limitações, sendo a mais importante a baixa percentagem de microrganismos cultiváveis em relação ao número total de microrganismos colonizadores, sendo importante utilizar técnicas complementares como a análise por MEV e a sequenciação de nova geração, sem isolamento do DNA.

Atendendo às limitações associadas à caracterização morfológica, os isolados fúngicos foram também analisados por duas técnicas espectrais distintas – FTIR e Raman - de forma a obter informação que possa complementar a caracterização dos microrganismos e o desenvolvimento de abordagens que permitam a identificação *in situ* das comunidades fúngicas que proliferam em obras de arte.

4.3. Caracterização Espectral

Os isolados fúngicos foram incubados durante 7 dias a 28°C em meio MEA, e as colónias foram analisados diretamente por FTIR e Raman.

4.3.1. FTIR

O estudo comparativo dos espectros de FTIR obtidos para os isolados fúngicos dos fungos isolados indica bandas de absorção específicas na região 1650-1500 cm⁻¹, que pode ser considerada um marcador para a deteção de microrganismos. No entanto, cada espécie tem o seu próprio perfil, como já tinha sido investigado por outros autores [25].

De modo a anular a contribuição do meio de cultura na análise dos isolados fúngicos, foi também efetuado o espectro deste (Figura 28). Neste espectro, são de destacar os picos a 3398 (O-H), 1631 (C=O) e 1064 (ν C-O) cm⁻¹.

Resultados e Discussão

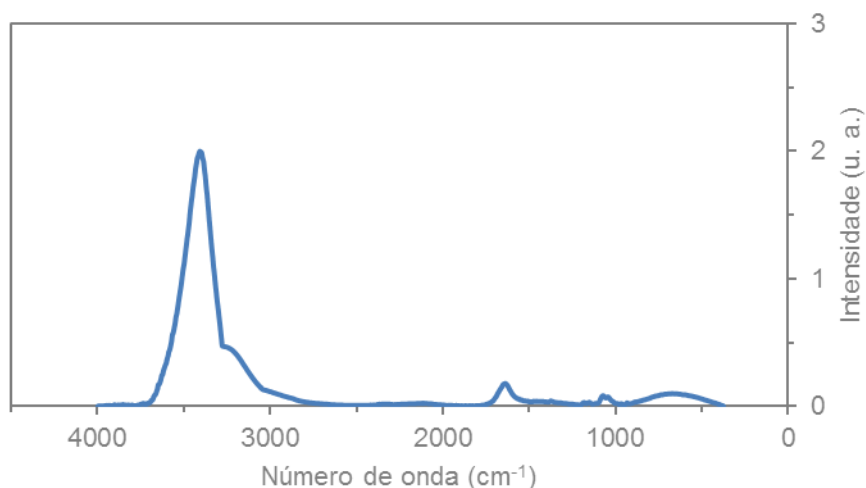


Figura 28 - Espectro de FTIR do meio de cultura MEA.

Para melhor comparar os espectros obtidos para cada microrganismo, estes foram agrupados por gêneros segundo uma tabela de identificação provisória (Tabela 2).

Na figura 29, estão representados os espectros dos isolados fúngicos do gênero *Aspergillus*. Nesta figura, é possível observar que o isolado fúngico Z4F4 apresenta picos na zona de 1200 a 1500 cm^{-1} , enquanto que o isolado fúngico P2-3 não apresenta.

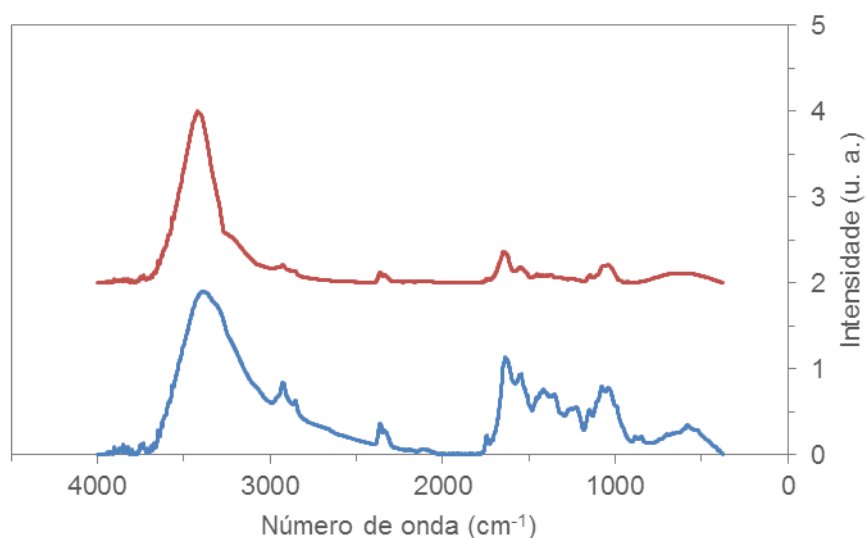


Figura 29 – Espectros de FTIR dos isolados fúngicos do gênero *Aspergillus*: Z4F4 (azul) e P2-3 (vermelho).

A figura 30 representa os espectros dos dois isolados fúngicos do gênero *Fusarium* e são notórias algumas diferenças entre os dois espectros. O isolado fúngico NEF29 apresenta alguns picos que o isolado fúngico SEF7 não apresenta, dos quais são exemplos os picos a 1740 ($\text{C}=\text{O}$), 2848 (ν C-H simétricas de $>\text{CH}_2$ de ácidos gordos) e 2920 (ν C-H assimétricas de $>\text{CH}_2$ de ácidos gordos) cm^{-1} .

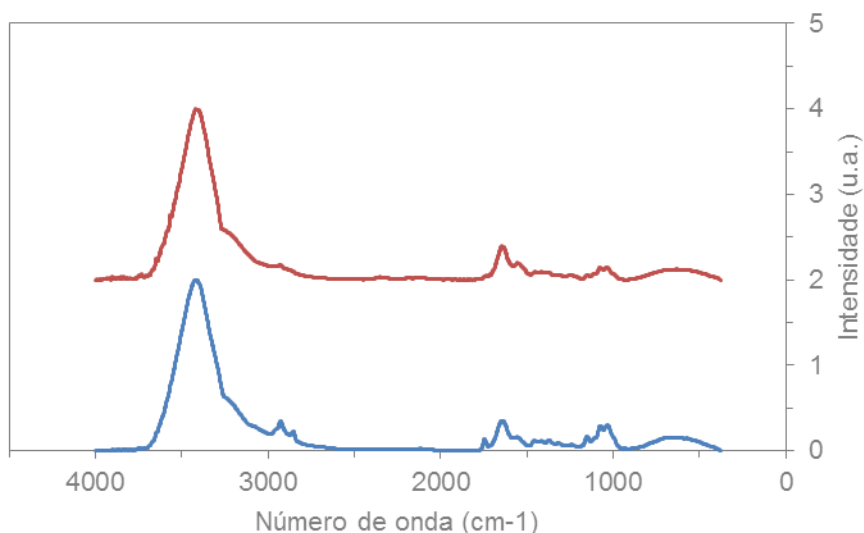


Figura 30 - Espectros de FTIR dos isolados fúngicos do gênero *Fusarium*: NEF29 (azul) e SEF7 (vermelho).

A figura 31 representa o espectro do isolado fúngico do gênero *Mucor*, onde, para além dos picos que também se encontram no espectro do meio de cultura utilizado, são também de destacar os picos a 1535 (δ C-N-H), 2343 (grupo -OH), 2848 (ν C-H simétricas de $>\text{CH}_2$ de ácidos gordos) e 2917 (ν C-H assimétricas de $>\text{CH}_2$ de ácidos gordos) cm⁻¹.

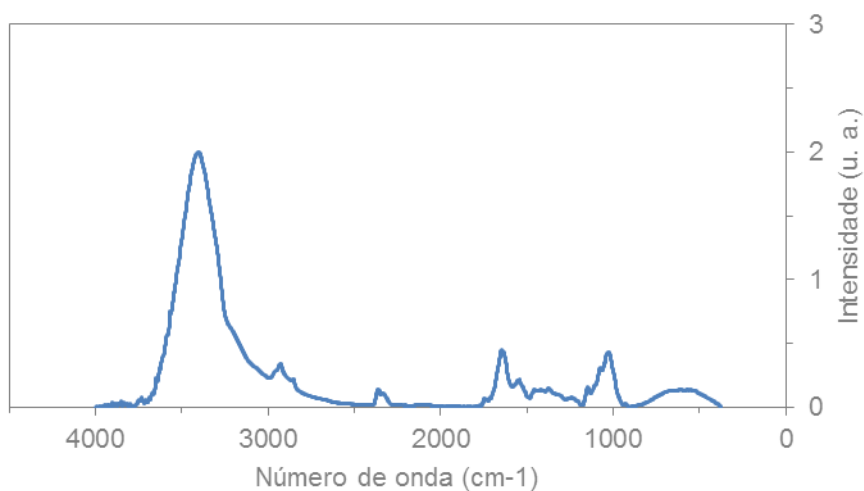


Figura 31 - Espectro de FTIR do isolado fúngico do gênero *Mucor*: Altar 2-E.

A figura 32 representa o espectro do isolado fúngico do gênero *Rhodotorula*, que é muito semelhante ao espectro do meio de cultura utilizado. Há apenas dois picos que se destacam: 2921 (ν C-H assimétricas de $>\text{CH}_2$ de ácidos gordos) e 1538 (δ C-N-H) cm⁻¹.

Resultados e Discussão



Figura 32 - Espectro de FTIR do isolado fúngico do género *Rhodotorula*: CPIL1.

A figura 33 representa os espectros dos isolados fúngicos leveduriformes, que não diferem do espectro do meio de cultura utilizado, mas são bastante semelhantes entre si.

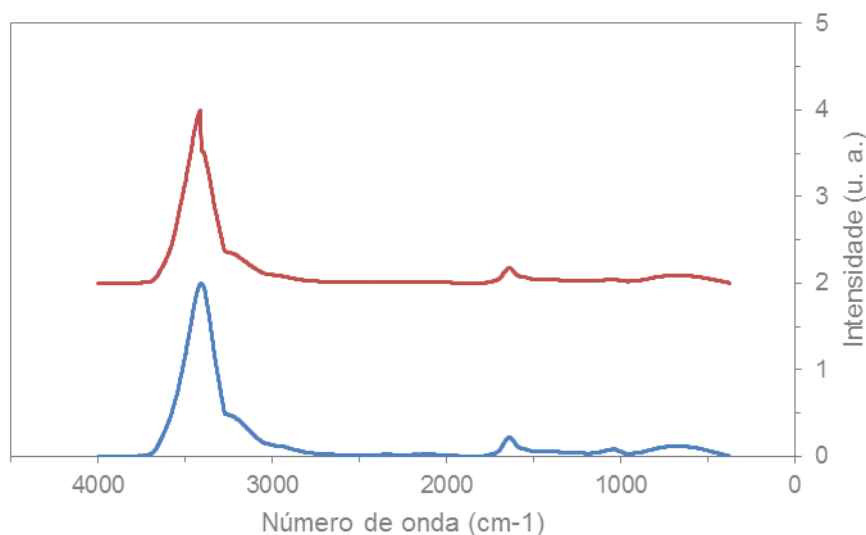


Figura 33 - Espectros de FTIR dos isolados fúngicos leveduriformes: Z1LA e Z1LB.

A figura 34 representa os espectros dos isolados fúngicos do género *Penicillium*. Nesta figura, há dois espectros que se destacam (dos isolados fúngicos P3A4F1 e P5F2) pois não apresentam vários dos picos que os outros espectros apresentam, como por exemplo, 2916 (ν C-H assimétricas de $>\text{CH}_2$ de ácidos gordos) e 2340 (grupo -OH) cm^{-1} . A presença destes picos permitiu identificar estirpes do género *Penicillium*. O isolado fúngico P5-3 Preto A apresenta picos nas zonas referidas anteriormente, mas são muito ténues e, por isso, também há dúvidas quanto ao seu género. Todos os outros isolados fúngicos (Z9-F1, Z11-F2, Z14-F1, NEF27, Altar 2-

Resultados e Discussão

Coluna B, Altar 2-Coluna F e Altar 2-I) apresentam picos nos mesmos comprimentos de onda.

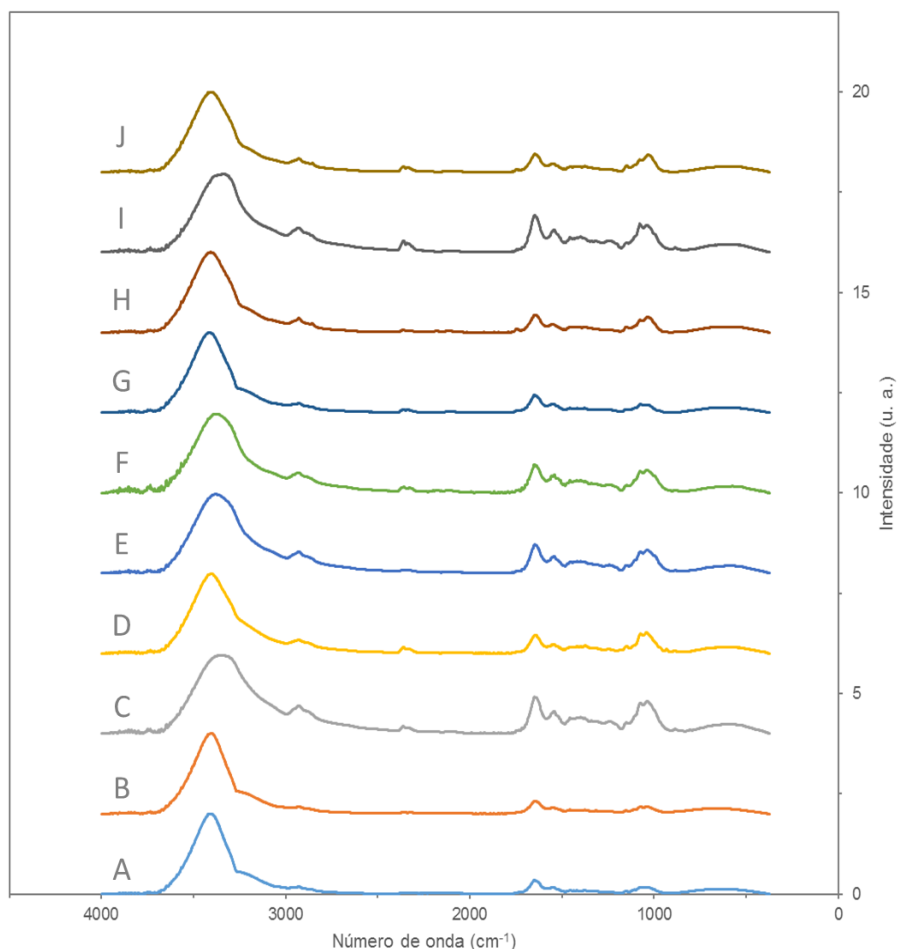


Figura 34 - Espectros de FTIR dos isolados fúngicos do gênero *Penicillium*: P3A4F1 (A), P5F2 (B), Z9-F1 (C), Z11-F2 (D), Z14-F1 (E), NEF27 (F), P5-3 Preto A (G), Altar 2-Coluna B (H), Altar 2-Coluna F (I) e Altar 2-K (J).

Na figura 35, estão representados os espectros dos isolados fúngicos do gênero *Cladosporium*. De entre os vários espectros, distinguem-se dois grupos: os isolados fúngicos que não apresentam picos a 2344 cm^{-1} (ν O-H), como é o caso de Z4F2, SA-5E, P4-5 Verde, Altar 2-Coluna C, Altar 2-I e Fa5a; sendo que os restantes isolados fúngicos representados no gráfico apresentam picos neste comprimento de onda. Nos isolados fúngicos Z4F2, P4-5 Verde, Altar 2-Coluna C e FA5a é possível observar-se que o pico a 2916 cm^{-1} (ν C-H assimétricas de $>\text{CH}_2$ de ácidos gordos) e a 2340 cm^{-1} (grupo -OH) é bastante ténue, ou não existe de todo, ao contrário do que acontece para os restantes isolados fúngicos.

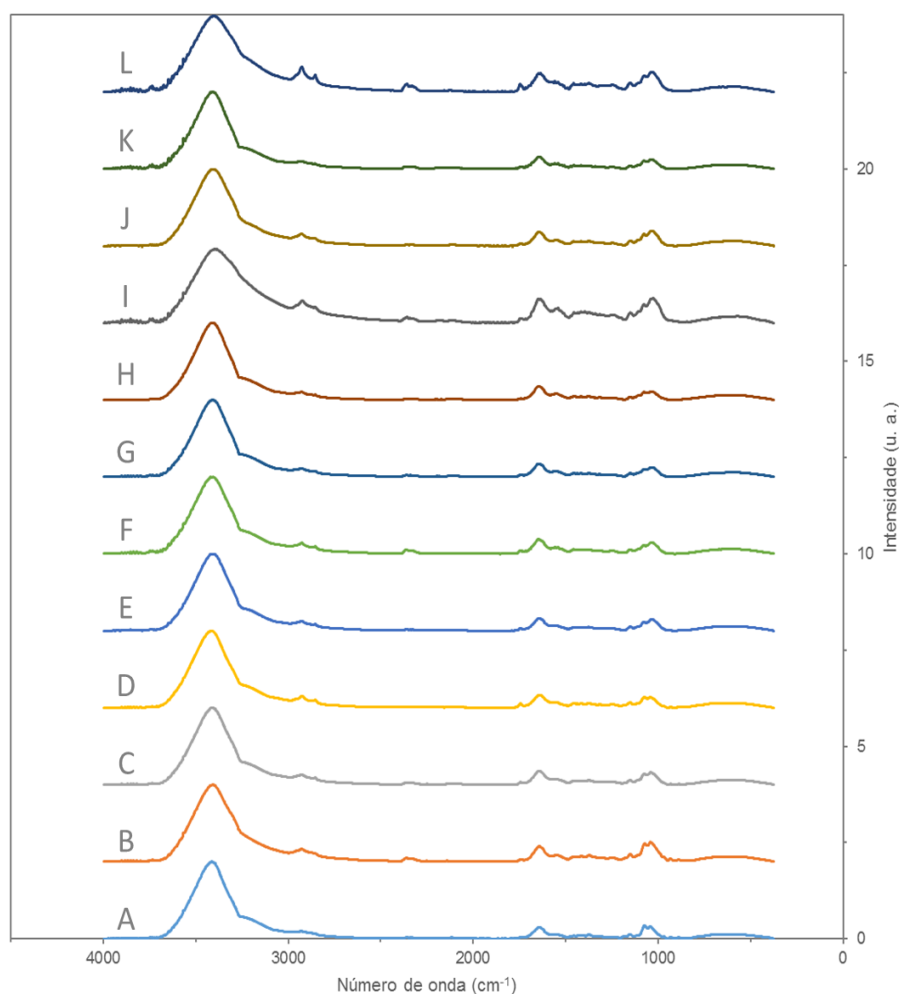


Figura 35 - Espectros de FTIR dos isolados fúngicos do género *Cladosporium*: Z4F2 (A), Z6-F2 (B), SA-5B (C), SA-5E (D), NEF11 (E), P2-1 (F), P4-5 Verde (G), Altar 2-Coluna C (H), Altar 2-D (I), Altar 2-I (J), FA5a (K) e FA7b (L).

Na figura 36, estão representados os espectros de alguns dos isolados fúngicos aos quais as suas características morfológicas não permitiram uma identificação prévia. Foram escolhidos sete, cujas diferenças são mais perceptíveis. Por exemplo: picos a 2344 cm^{-1} (ν O-H) são apenas visíveis nos isolados fúngicos Z15-F1b e IL12a; os isolados fúngicos P1A3F1 e CRIF2 apresenta um pico muito tênue a 1722 cm^{-1} (ν C=O), enquanto que o isolado FA7a não apresenta qualquer pico.

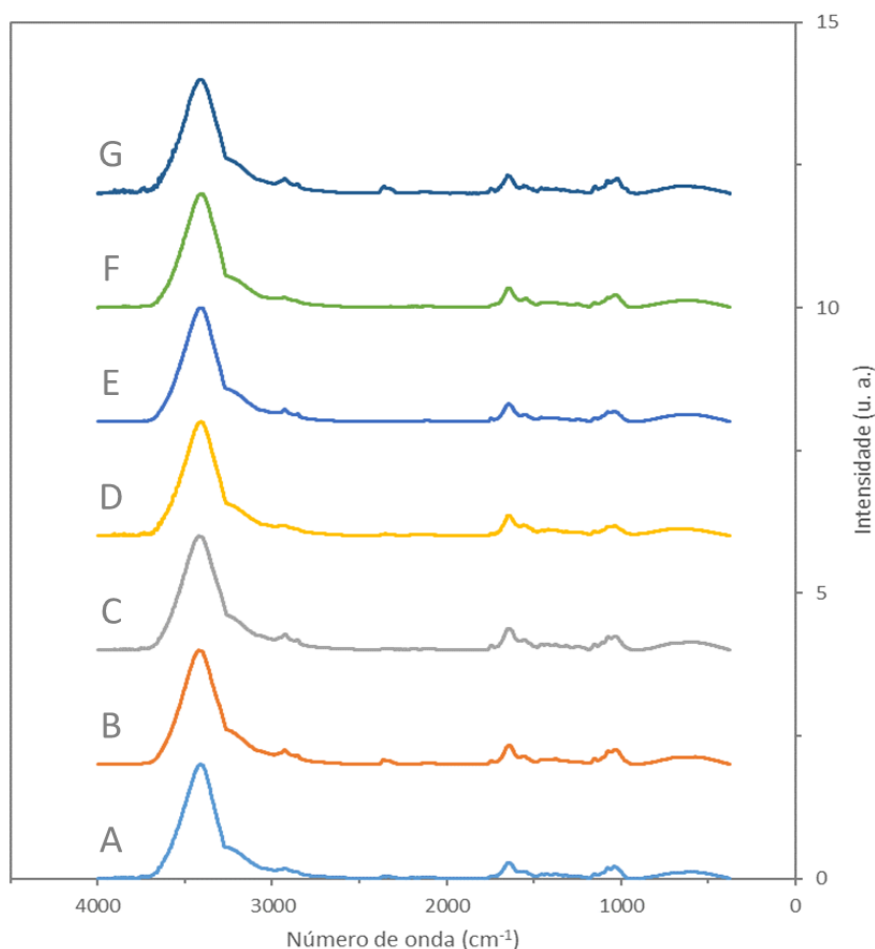


Figura 36 - Espectro de FTIR de alguns dos isolados fúngicos cujas características não permitiram uma identificação prévia: P1A3F1 (A), Z15-F1b (B), SA-3F (C), CRIF2 (D), P2-2A (E), FA7a (F) e IL12a (G).

Depois de analisados todos os espectros, concluiu-se que a presença de contaminação fúngica poderá estar mais associada a picos a 1650 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} (amida I e II), bem como a 3350 cm^{-1} (ligação N-H).

Esta abordagem espectral permitiu excluir alguns isolados fúngicos do género em que tinham sido inseridos inicialmente, onde apenas eram tidas em conta as características morfológicas – um dos exemplos são os dois isolados fúngicos P3A4F1 e P5F2, inicialmente associados ao género *Penicillium*, em que as diferenças vibracionais são bem nítidas quando comparados com os outros espectros deste grupo.

Sendo assim possível excluir isolados fúngicos de um género inicialmente atribuído ao comparar os picos existentes no espectro de FTIR-ATR com os dos outros espectros do mesmo género, o que contribui para o processo de identificação. Em estudos posteriores, com diferentes condições de análise, poderá ser possível associar picos característicos a microrganismos, funcionando como uma assinatura espectral específica.

Resultados e Discussão

4.3.2. Espectroscopia Raman

Os isolados fúngicos foram também analisados por Raman, de forma a obter informação completa para a caracterização de agentes de contaminação microbiológica.

Dado que os microrganismos foram analisados diretamente na placa de Petri, na figura 37, está representado o espectro do meio de cultura MEA de forma a identificar os seus picos característicos e perceber a sua contribuição na análise dos isolados microbiológicos. Este espectro apresenta vários picos, entre os quais a 122 (vibrações *lattice*), 620 (C=S), 1001 (anéis aromáticos), 1030 (Si-O-C), 1194 (ácido sulfónico) e 1610 (ácido carboxílico) cm^{-1} .

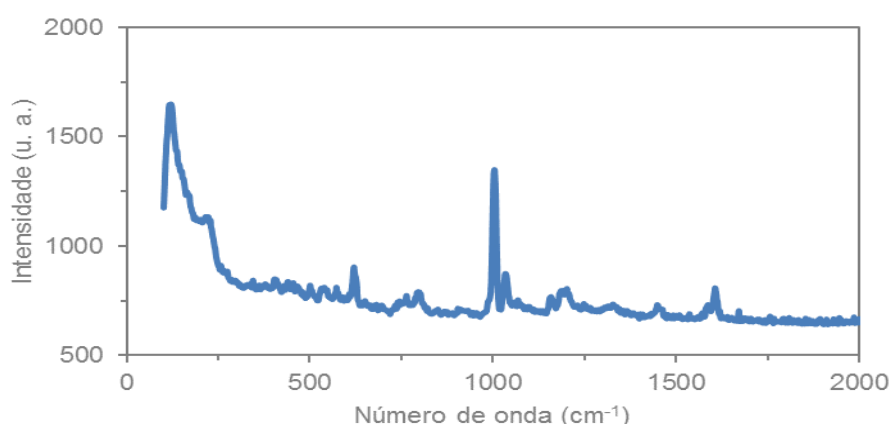


Figura 37 - Espectro de Raman do meio de cultura MEA

Ao analisar a figura 38, é possível perceber que através da análise apenas por espectroscopia Raman é difícil distinguir os diferentes isolados fúngicos em análise, uma vez que praticamente todos os géneros observados apresentaram perfil espectral semelhante e picos na mesma região. Nesta figura, estão representados 4 isolados fúngicos diferentes: Z4F2 (*Cladosporium*), P1A4F1 (micélio), NEF29 (*Fusarium*) e IL10b (micélio, mas com características morfológicas bastante diferentes de P1A4F1), e, com a exceção do isolado fúngico Z4F2, todos apresentam picos semelhantes. O isolado fúngico Z4F2 apresenta picos na zona de 650 a 950 cm^{-1} que os outros 3 isolados fúngicos não apresentam.

Resultados e Discussão

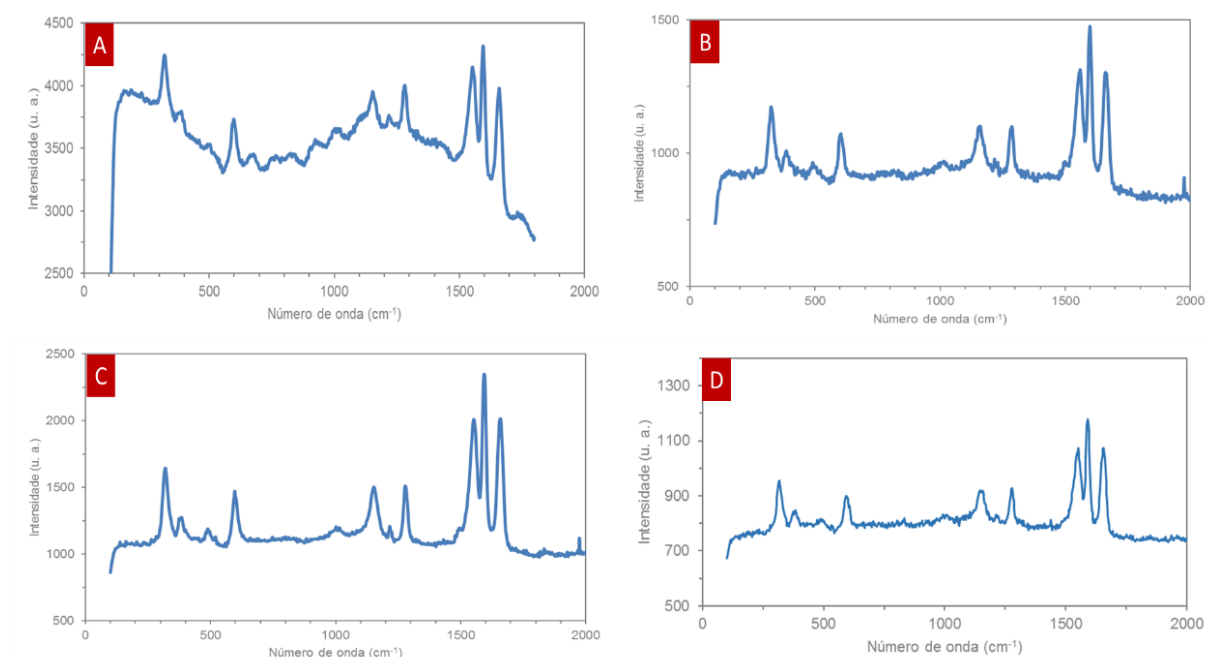


Figura 38 – Espectros de Raman dos isolados fúngicos Z1LA (A), P1A4F1 (B), NEF29 (C) e IL10b (D).

Apesar desta metodologia não permitir claramente discriminar os microrganismos isolados, esta abordagem poderá constituir uma ferramenta muito útil porque permite obter perfis espectrais da presença de contaminação fúngica - o que pode ser uma mais valia para amostras reais e análises *in situ*, uma vez que o espectrómetro Raman pode ser portátil e as análises de Raman não destrutivas, podendo ser feitas diretamente sobre os objetos. Esta metodologia também complementa os resultados obtidos com a espectrometria FTIR.

4.4. Caracterização Molecular

4.4.1. RAPD-PCR

Devido ao elevado número de isolados fúngicos, optou-se por efetuar três dendogramas (Figuras 39-41).

Através da análise do gel de eletroforese representado na figura 39, é possível observar que os produtos de PCR resultantes da amplificação do DNA presente existentes nas diferentes amostras estão compreendidos entre 234 e 2003 bp, exceto os isolados fúngicos FA5b, FA6c, Z9-F1, Z11-F2 e CPIL1.

Resultados e Discussão

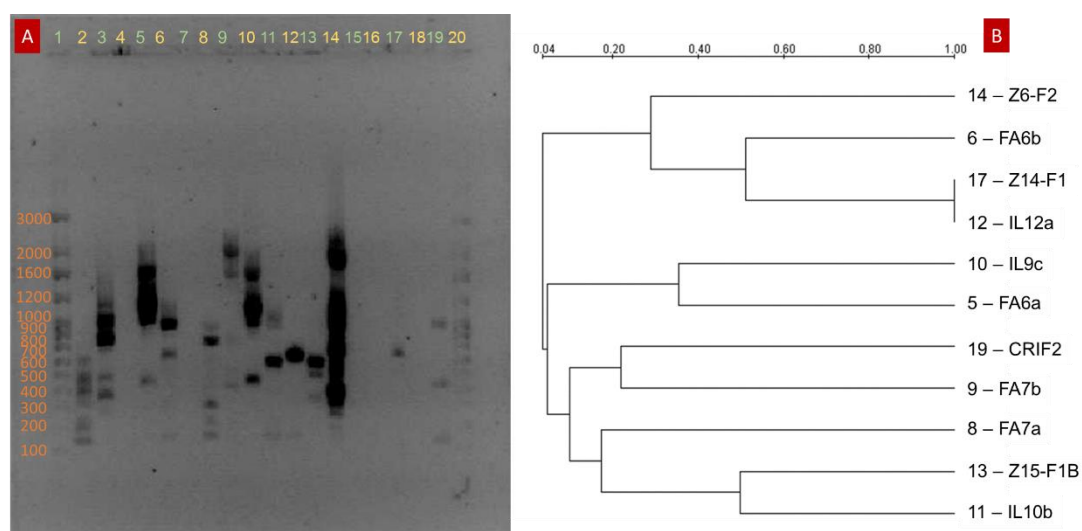


Figura 39 - Gel de eletroforese (A) e dendograma (B) de RAPD-PCR: 1 e 20 – Marcador DNA 100 bp; 2 – Branco; 3 – FA5a; 4 – FA5b; 5 – FA6a; 6 – FA6b; 7 – FA6c; 8 – FA7a; 9 – FA7b; 10 – IL9c; 11 – IL10b; 12 – IL12a; 13 – Z15-F1b; 14 – Z6-F2; 15 – Z9-F1; 16 – Z11-F2; 17 – Z14-F1; 18 – CPIL1; CRIF2.

Na tabela 11 apresenta-se um resumo do tamanho das bandas correspondentes aos produtos de M13-PCR para cada um dos isolados fúngicos analisados por eletroforese (figura 39), de forma a evidenciar semelhanças e diferenças entre elas.

O dendograma representado na figura 39 permitiu formar dois *clusters* principais. No primeiro *cluster* observa-se que o isolado fúngico Z6-F2 tem 30% de similaridade com outros três isolados fúngicos que se encontram noutra subdivisão. Segundo o dendograma, o isolado fúngico FA6c tem 50% de similaridade com os isolados fúngicos Z14-F1 e IL12a, que supostamente seriam o mesmo isolado fúngico, uma vez que têm 100% de similaridade. No entanto, estes isolados fúngicos não apresentam semelhanças a nível morfológico, pelo que este resultado pode dever-se ao facto de ambos só apresentarem uma banda no gel (Tabela 12).

O segundo *cluster* divide-se em duas subunidades. A primeira subunidade contém dois isolados fúngicos, IL9c e FA6a, têm uma proximidade de, aproximadamente, 35%. A segunda subunidade divide-se em duas subunidades, onde na primeira subunidade é possível ver que há uma similaridade de 20% entre os isolados fúngicos CRIF2 e FA7b, e a segunda subunidade se divide novamente. Nesta subunidade, há uma similaridade de 20% entre o isolado fúngico FA7a e outros dois isolados fúngicos, Z15-F1b e IL10b, que têm uma similaridade de 50% entre eles.

Resultados e Discussão

Tabela 11 – Fragmentos amplificados por M13-PCR nos microrganismos apresentados na figura 39.

Bandas (bp)	Microrganismos											
	FA5a	FA6a	FA6b	FA7a	FA7b	IL9c	IL10b	IL12a	Z15-F1b	Z6-F2	Z14-F1	CRIF2
234												X
270				X								
352				X								
383										X		
433				X						X		
490	X								X			
502				X						X		
539					X							X
577	X	X				X						
639					X				X			
691										X		
736				X			X		X			
774			X		X			X		X	X	
863	X			X	X							
969				X						X		
1013	X		X			X						
1045		X					X					X
1096						X						
1156	X	X										
1606		X				X						
1650					X							
1864										X		
2003					X							

Através da análise do gel de eletroforese representado na figura 40, é possível observar que os produtos PCR existentes nas diferentes amostras estão compreendidos entre 165 e 2523 bp, exceto os isolados fúngicos NEF29, Altar 2-Coluna C, Altar 2-Coluna F e Altar 2-K que não apresentaram bandas.

Resultados e Discussão

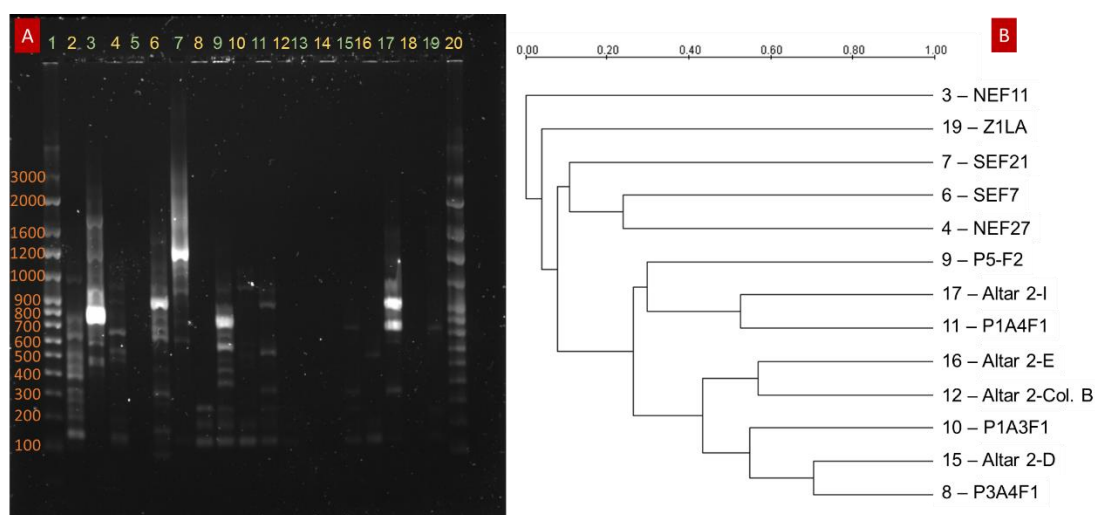


Figura 40 - Gel de eletroforese (A) e dendograma (B) de RAPD-PCR: 1e 20 – Marcador DNA 100 bp; 2 – Branco; 3 – NEF11; 4 – NEF27; 5 – NEF29; 6 – SEF7; 7 – SEF21; 8 – P3A4F1; 9 – P5F2; 10 – P1A3F1; 11 – P1A4F1; 12 – Altar 2-Coluna B; 13 – Altar 2-Coluna C; 14 – Altar 2-Coluna F; 15 – Altar 2-D; 16 – Altar 2-E; 17 – Altar 2-I; 18 – Altar 2-K; 19 – Z1LA.

A tabela 12 sintetiza as bandas correspondentes aos produtos de PCR de cada um dos isolados fúngicos presentes no gel de agarose representado na figura 40, de forma a evidenciar semelhanças e diferenças entre elas.

O dendograma representado na figura 40 permitiu verificar que existem dois clusters principais e, enquanto que o primeiro contém apenas o isolado fúngico NEF11 (que não tem proximidade com o segundo *cluster*), o segundo divide-se em duas subunidades. A primeira delas (Z1LA) tem 5% de similaridade com a segunda, que se divide novamente: o isolado fúngico SEF21 tem 10% de similaridade com a subunidade onde se encontram os isolados fúngicos SEF7 e NEF27, que têm 25% de proximidade entre si. O isolado fúngico P5-F2 tem uma similaridade de 30% da subunidade que contém os isolados fúngicos Altar 2-I e P1A4F1, que têm entre si 50% de similaridade. Os isolados fúngicos Altar 2-E e Altar 2-Coluna B têm, aproximadamente, 60% de similaridade entre si e cerca de 40% dos isolados fúngicos que se encontram na outra subunidade. Esta última contém duas divisões que têm 55% de similaridade entre si, sendo que a primeira contém apenas o isolado fúngico P1A3F1, e a segunda contém os isolados fúngicos Altar 2-D e P3A4F1, que têm 70% de proximidade entre si.

Resultados e Discussão

Tabela 12 - Fragmentos amplificados por M13-PCR nos microrganismos apresentados na figura 40.

Bandas (bp)	Microrganismos												
	NEF11	NEF27	SEF7	SEF21	P3A4F1	P5F2	P1A3F1	P1A4F1	Altar 2-Coluna B	Altar 2-D	Altar 2-E	Altar 2-I	Z1LA
165			X										
209			X		X	X	X	X	X	X	X	X	
223		X											
248			X										
255													X
265					X	X	X	X		X			
286											X		
337					X	X		X		X			
362			X										X
406			X										
440								X		X		X	
475						X							
548			X			X							
567	X												
585		X				X							
634		X									X		
647							X						
673								X					
700						X							
703	X												
733				X			X						
760		X	X										
795			X			X							
842				X						X			X
866						X						X	
882			X										
915	X												
940			X										
982		X											
1007			X					X				X	
1074	X												
1129		X	X	X		X	X						
1183												X	
1289				X									
1440				X									
1558	X			X									
1804				X									
2244	X												
2523				X									

Através da análise do gel de eletroforese representado na figura 41, é possível observar que os produtos PCR existentes nas diferentes amostras estão

Resultados e Discussão

compreendidos entre 159 e 2370 bp, exceto o isolado fúngico Z4F4 que não amplificou.

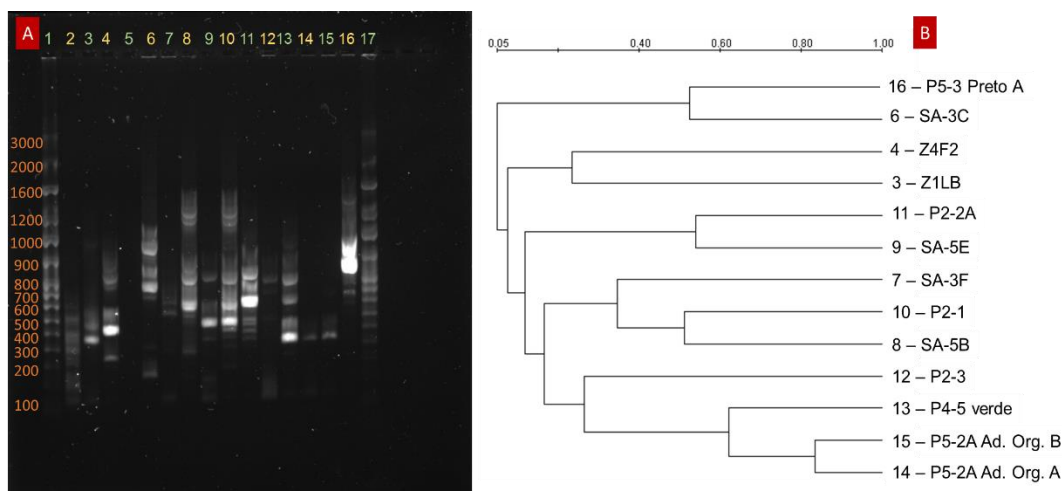


Figura 41 - Gel de eletroforese (A) e dendograma (B) de RAPD-PCR: 1e 17 - Marcador DNA 100 bp; 2 - Branco; 3 - Z1LB; 4 - Z4F2; 5 - Z4F4; 6 - SA-3C; 7 - SA-3F; 8 - SA-5B; 9 - SA-5E; 10 - P2-1; 11 - P2-2A; 12 - P2-3; 13 - P4-5 verde; 14 - P5-2A Ad. Org. A; 15 - P5-2A Ad. Org. B; 16 - P5-3 Preto A.

A tabela 13 sintetiza as bandas correspondentes aos produtos de PCR de cada um dos isolados fúngicos presentes no gel de agarose representado na figura 41, de forma a evidenciar semelhanças e diferenças entre elas.

O dendograma representado na figura 41 permitiu verificar que existem dois *clusters* principais e que ambos têm duas subdivisões. O primeiro *cluster* contém os isolados fúngicos P5-3 Preto A e SA-3C, que têm cerca de 55% de similaridade entre si. O segundo *cluster* contém duas subunidades: a primeira contém os isolados fúngicos Z4F2 e Z1LB que têm cerca de 20% de similaridade entre si e 5% de proximidade com a outra subunidade. Esta subunidade volta a dividir-se, sendo que a primeira divisão contém os isolados fúngicos P2-2A e SA-5E, que têm, aproximadamente, 50% de similaridade entre si, e 10% de similaridade entre a outra divisão. O isolado fúngico SA-3F tem cerca de 35% de similaridade com a subunidade que contém os isolados fúngicos P2-1 e SA-5B, que têm 50% de similaridade entre si. O isolado fúngico P2-3 tem, aproximadamente, 30% de similaridade com a subunidade seguinte, que contém duas divisões: o isolado fúngico P4-5 Verde, que se encontra na primeira subdivisão, tem 50% de similaridade com a segunda subdivisão. Esta contém os isolados fúngicos P5-2A Ad. Org. A e P5-2A Ad. Org. B, que apresentam uma similaridade de 80%, o que se reflete nas suas semelhanças morfológicas.

Resultados e Discussão

Tabela 13 - Fragmentos amplificados por M13-PCR nos microrganismos apresentados na figura 41.

Bandas (bp)	Microrganismos												
	Z1LB	Z4F2	SA-3C	SA-3F	SA-5B	SA-5E	P2-1	P2-2A	P2-3	P4-5 verde	P5-2A Ad. Org. A	P5-2A Ad. Org. B	P5-3 Preto A
159				X		X			X	X	X	X	
337			X		X	X							
360							X						
435		X											
464					X								
511			X				X						
523								X		X	X	X	
547	X												
572						X	X	X					
608							X						
611		X											
642	X												
681						X	X	X					
749	X	X		X	X								
845				X	X		X	X		X			X
929			X						X				X
999			X										
1020					X		X		X	X			
1064		X				X		X					
1098			X		X								X
1367			X										X
1960					X		X						
2121					X		X						
2370													X

A análise do polimorfismo genético permite avaliar a variabilidade dentro do mesmo género e da mesma espécie. Esta pode ser, por exemplo, característica também do local de onde a estirpe fúngica foi isolada (influência da fonte de nutrientes azoto e carbono, temperatura, humidade).

Esta metodologia poderá ser bastante vantajosa, uma vez que, determina o grau de similaridade entre os microrganismos estudados que, ao ser comparado com as suas características morfológicas e espectrais, pode levar a uma identificação.

Resultados e Discussão

4.4.2. Amplificação e sequenciação de regiões ITS

Após extração do DNA dos isolados fúngicos, estes foram amplificados com *primers* da região ITS, utilizando dois pares diferentes (ITS1-ITS4 e ITS1-ITS5). Os produtos de amplificação foram purificados e posteriormente sequenciados.

Na figura 42(A), apresenta-se o perfil eletroforético correspondente à amplificação da região ITS dos isolados fúngicos. A quantificação dos produtos de PCR encontra-se na Tabela 16 do Anexo H.

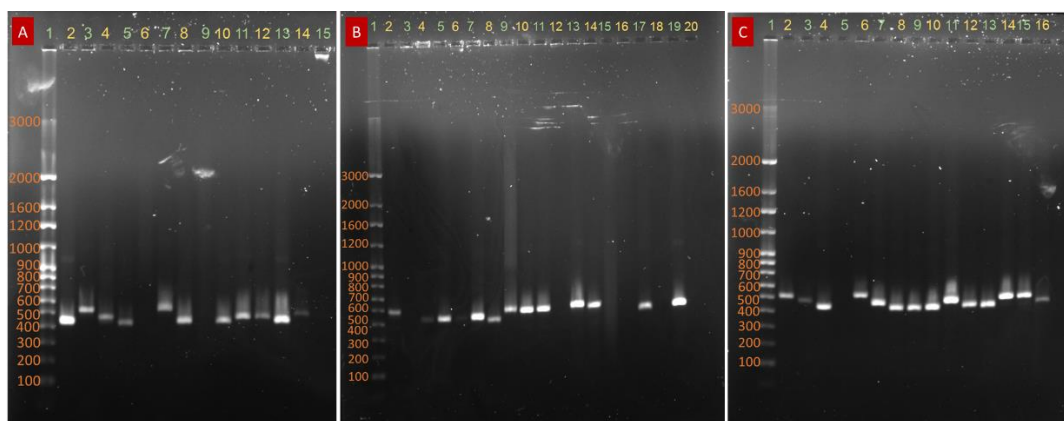


Figura 42 - Géis de eletroforese de ITS: (A) 1 - marcador DNA 100 bp; 2 - FA5a; 3 - FA5b; 4 - FA6a; 5 - FA6b; 6 - FA6c; 7 - FA7a; 8 - FA7b; 9 - IL9c; 10 - IL10b; 11 - IL12a; 12 - Z15-F1b; 13 - Z6-F2; 14 - Z9-F1; 15 - Z11-F2. (B) 1 - marcador DNA 100 bp; 2 - Z14-F1; 3 - CPIL1; 4 - CRIF2; 5 - NEF11; 6 - NEF27; 7 - NEF29; 8 - SEF7; 9 - SEF21; 10 - P3A4F1; 11 - P5F2; 12 - P1A3F1; 13 - P1A4F1; 14 - Altar 2-Coluna B; 15 - Altar 2-Coluna C; 16 - Altar 2-Coluna F; 17 - Altar 2-D; 18 - Altar 2-E; 19 - Altar 2-I; 20 - Altar 2-K. (C) 1 - marcador DNA 100 bp; 2 - Z1LA; 3 - Z1LB; 4 - Z4F2; 5 - Z4F4; 6 - SA-3C; 7 - SA-3F; 8 - SA-5B; 9 - SA-5B; 10 - P2-1; 11 - P2-2A; 12 - P2-3; 13 - P4-5 Verde; 14 - P5-2A Ad. Org. A; 15 - P5-2A Ad. Org. B; 16 - P5-3 Preto A.

Procedeu-se também à sequenciação da região ITS dos isolados fúngicos. A tabela 14 relaciona a identificação proposta inicialmente para os diferentes isolados, baseada nas características morfológicas, com os resultados obtidos após sequenciação da região ITS de cada um dos isolados fúngicos. É possível afirmar que, na maioria dos casos, os gêneros atribuídos aos isolados fúngicos com base na sua morfologia, coincidem com os gêneros obtidos através do alinhamento das sequências nucleotídicas. Houve apenas três exceções: os isolados fúngicos P3A4F1, P5F2 e P5-3 Preto A, que tinham sido anteriormente considerados pertencentes ao gênero *Penicillium*, e que com base na sequenciação foram classificados no gênero *Talaromyces* (P3A4F1 e P5F2) e *Oidiodendron* (P5-3 Preto A).

Resultados e Discussão

Tabela 14 - Comparação entre a identificação baseada nas características morfológicas e a sequenciação.

Local	Isolado fúngico	Identificação provisória	Sequenciação
Casas Pintadas	Z1LA	levedura sp.1	<i>Cryptococcus adeliensis</i>
	Z1LB	levedura sp.2	Inconclusivo
	Z4F2	<i>Cladosporium</i> sp.1	<i>Cladosporium</i>
	Z4F4	<i>Aspergillus</i> sp.1	Inconclusivo
Marfim	P1A3F1	micélio 1	Inconclusivo
	P1A4F1	micélio 2	Inconclusivo
	P3A4F1	<i>Penicillium</i> sp.1	<i>Talaromyces</i>
	P5F2	<i>Penicillium</i> sp.2	<i>Talaromyces</i>
Santa Clara	Z6-F2	<i>Cladosporium</i> sp.2	<i>Cladosporium halotolerans</i>
	Z9-F1	<i>Penicillium</i> sp.3	Inconclusivo
	Z11-F2	<i>Penicillium</i> sp.4	Inconclusivo
	Z14-F1	<i>Penicillium</i> sp.5	Inconclusivo
	Z15-F1b	micélio 3	<i>Aspergillus versicolor</i>
Santo Aleixo	SA-3C	micélio 4	<i>Stereum</i>
	SA-3F	micélio 5	Inconclusivo
	SA-5B	<i>Cladosporium</i> sp.3	<i>Cladosporium halotolerans</i>
	SA-5E	<i>Cladosporium</i> sp.4	Inconclusivo
Sé	CPIL1	<i>Rhodotorula</i> sp.1	Inconclusivo
	CRIF2	micélio 6	Inconclusivo
	NEF11	<i>Cladosporium</i> sp.5	<i>Cladosporium</i>
	NEF27	<i>Penicillium</i> sp.6	Inconclusivo
	NEF29	<i>Fusarium</i> sp.1	<i>Fusarium tricinctum</i>
	SEF7	<i>Fusarium</i> sp.2	<i>Fusarium</i>
	SEF21	micélio 7	<i>Dothideomycetes</i>
Convento Saudação	P2-1	<i>Cladosporium</i> sp.6	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
	P2-2A	micélio 8	Inconclusivo
	P2-3	<i>Aspergillus</i> sp.2	<i>Aspergillus</i>
	P4-5 verde	<i>Cladosporium</i> sp.7	<i>Cladosporium</i>
	P5-2A Ad. Org. A	micélio 9	Inconclusivo
	P5-2A Ad. Org. B	micélio 10	Inconclusivo
	P5-3 Preto A	<i>Penicillium</i> sp.7	<i>Oidiodendron</i>

Resultados e Discussão

Tabela 14 - Comparação entre a identificação baseada nas características morfológicas e a sequenciação. (continuação)

Local	Isolado fúngico	Identificação provisória	Sequenciação
Talha Dourada	Altar 2 - Coluna B	<i>Penicillium</i> sp.8	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	Altar 2 - Coluna C	<i>Cladosporium</i> sp.8	Inconclusivo
	Altar 2 - Coluna F	<i>Penicillium</i> sp.9	Inconclusivo
	Altar 2 - D	<i>Cladosporium</i> sp.9	<i>Cladosporium</i>
	Altar 2 - E	<i>Mucor</i> sp.1	Inconclusivo
	Altar 2 - I	<i>Cladosporium</i> sp.10	<i>Cladosporium</i>
	Altar 2 - K	<i>Penicillium</i> sp.10	Inconclusivo
Papel	FA5a	<i>Cladosporium</i> sp.11	<i>Cladosporium</i>
	FA5b	micélio 11	Inconclusivo
	FA6a	micélio 12	<i>Diaporthe ambigua</i>
	FA6b	micélio 13	Inconclusivo
	FA6c	micélio 14	Inconclusivo
	FA7a	micélio 15	<i>Schizophyllum commune</i>
	FA7b	<i>Cladosporium</i> sp.12	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
	IL9c	micélio 16	Inconclusivo
	IL10b	micélio 17	Inconclusivo
	IL12a	micélio 18	Inconclusivo

A sequenciação foi particularmente útil para vários isolados fúngicos cujas características morfológicas não tinham permitido chegar a nenhuma classificação, como foi o caso dos isolados fúngicos Z15-F1b, SA-3C, SEF21, FA6a e FA7a, bem como para a identificação de fungos até então não encontrados em bens patrimoniais. No entanto, para uma maior caracterização e diferenciação das estirpes é importante realizar uma abordagem polifásica que combine técnicas de caracterização fenotípica com a caracterização genética.

4.4.3. β -tubulina

Atualmente, recorre-se também à sequenciação de genes que codificam proteínas, uma vez que estes acumulam menos mutações e são menos variáveis, como é exemplo a β -tubulina. A β -tubulina pertence a uma pequena família de proteínas globulares que compõem os microtúbulos que constituem um dos maiores componentes no citoesqueleto dos eucariotas e atuam em vários processos, tais como suporte estrutural, transporte intracelular e segregação de DNA. A atividade desta proteína está relacionada com a viabilidade das células, podendo constituir um bom marcador biológico de fungos biodeteriogénicos do Património.

Resultados e Discussão

No gel de eletroforese representado na figura 43 (A), apenas os isolados fúngicos Z9-F1, Z11-F2 e CPIL1 não apresentam nenhuma banda amplificada com os *primers* da β -tubulina.

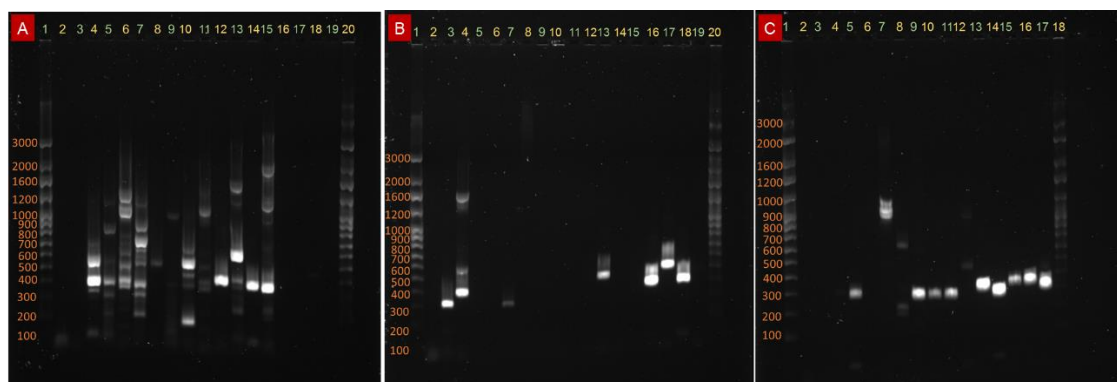


Figura 43 - Géis de eletroforese de β -tubulina: (A) 1 e 20 – Marcador DNA 100 bp; 2 e 3 – Branco; 4 – FA5a; 5 – FA5b; 6 – FA6a; 7 – FA6b; 8 – FA6c; 9 – FA7a; 10 – FA7b; 11 – IL9c; 12 – IL10b; 13 – IL12a; 14 – Z15-F1b; 15 – Z6-F2; 16 – Z9-F1; 17 – Z11-F2; 18 – Z14-F1; 19 – CPIL1. (B) 1 e 20 – Marcador DNA 100 bp; 2 – Branco; 3 – CRIF2; 4 – NEF11; 5 – NEF27; 6 – NEF29; 7 – SEF7; 8 – SEF21; 9 – P3A4F1; 10 – P5F2; 11 – P1A3F1; 12 – P1A4F1; 13 – Altar 2-Coluna B; 14 – Altar 2-Coluna C; 15 – Altar 2-Coluna F; 16 – Altar 2-D; 17 – Altar 2-E; 18 – Altar 2-I; 19 – Altar 2-K. (C) 1 e 18 – Marcador 100 bp; 2 – Branco; 3 – Z1LA; 4 – Z1LB; 5 – Z4F2; 6 – Z4F4; 7 – SA-3C; 8 – SA-3F; 9 – SA-5B; 10 – SA-5E; 11 – P2-1; 12 – P2-2A; 13 – P2-3; 14 – P4-5 verde; 15 – P5-2A Ad. Org. A; 16 – P5-2A Ad. Org. B; 17 – P5-3 Preto A.

No gel de eletroforese representado na figura 43 (B), a maioria dos isolados fúngicos não apresentou uma grande amplificação deste gene. O isolado fúngico SEF7 apresenta uma banda muito tênue, no entanto, os isolados fúngicos CRIF2, NEF11, Altar 2-Coluna B, Altar 2-D, Altar 2-E e Altar 2-I apresentam bandas bastante intensas no gel de eletroforese.

No gel de eletroforese visível na figura 43 (C), não foi possível observar nenhuma banda para os isolados leveduriformes (Z1LA e Z1LB). Também o isolado fúngico Z4F4 (*Aspergillus* sp.1) não apresentou amplificação. Os isolados fúngicos SA-3F (micélio 5) e P2-2A (micélio 8) apresentaram bandas muito tênues e todos os outros isolados fúngicos apresentaram bandas bem visíveis.

Posteriormente, foi feita a quantificação por PCR em Tempo Real para os isolados fúngicos que apresentaram maior expressão deste gene, designadamente P2-3 (*Aspergillus* sp.2), IL10b (micélio 17), Z15-F1b (*Aspergillus versicolor*), CRIF2 (micélio 6), Altar 2-Coluna B (*Penicillium brevicompactum*), Altar 2-D (*Cladosporium* sp.9), Altar 2-E (*Mucor* sp.1), Altar 2-I (*Cladosporium* sp.10) e P4-5 Verde (*Cladosporium* sp.7).

Na figura 43, está representada a quantificação do gene da β -tubulina de cada isolado fúngico analisado.

Resultados e Discussão

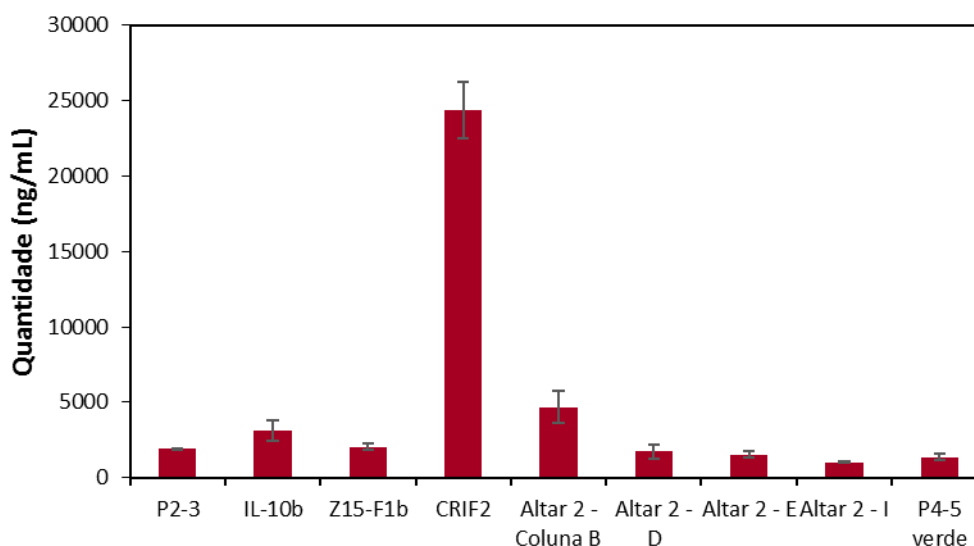


Figura 44 - Quantificação da β -tubulina em diferentes isolados fúngicos. A quantificação efetuou-se utilizando os valores de Ct das diferentes amostras numa curva de calibração com diluições decimais seriadas de *Cladosporium halotolerans* (SA-5B). As barras de erro correspondem aos valores do desvio padrão para $n=2$.

O nível de expressão deste gene variou entre 1011 ng/mL para o isolado fúngico Altar 2-I e 24405 ng/mL para o isolado fúngico CRIF2 (micélio 6), apresentou um nível de expressão muito superior às restantes.

Esta metodologia poderá vir a ser útil na discriminação da atividade metabólica da população microbiológica em amostras reais e no *screening* de microrganismos, uma vez que é possível inferir sobre a atividade metabólica relativa das comunidades microbianas presentes, havendo assim a possibilidade de correlacionar possíveis danos com a percentagem de agentes contaminantes e o seu estado metabólico.

5. Considerações Finais



Considerações Finais

A ação dos microrganismos nos bens patrimoniais tem sido alvo de vários estudos, dado a sua importância nas alterações provocadas em obras de arte. A proliferação de microrganismos pode provocar danos irreversíveis, como fissuras, perda de coesão do substrato, biofilmes, manchas ou alterações cromáticas. Sendo que, neste trabalho deu-se especial destaque aos fungos, uma vez que, devido aos danos que provocam, são um dos mais importantes agentes biodeteriorogénicos da Herança Cultural.

A identificação e caracterização destas comunidades microbianas é essencial tanto para prevenir como para reparar os danos provocados pelos agentes biodeteriorogénicos, sendo que devido às limitações das metodologias tradicionais, são necessárias técnicas adicionais para complementar a informações recolhidas.

Neste trabalho foram caracterizados diversos fungos, identificados como agentes biodeteriorogénicos de diferentes bens patrimoniais. Nessa caracterização foi utilizada uma abordagem integrada que combina métodos de caracterização morfológica das estirpes, como diferentes métodos espectrais e moleculares, resultando em grupos de dados genéticos e fenotípicos que se complementam, quer pela capacidade discriminatória dos resultados quer ainda pelo tipo de interação que possibilitam nas amostras (não invasivas ou micro-invasivas, destrutivas ou não destrutivas). A análise morfológica permitiu distinguir vários isolados fúngicos ao género, o que resultou numa identificação prévia, onde os principais géneros encontrados foram *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. A análise espectral constituiu um fator de distinção polimórfica dos géneros identificados, onde foi demonstrado que a contaminação biológica poderá estar associada a bandas de FTIR de 1650 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} (amida I e II), bem como a 3350 cm^{-1} (ligação N-H) ou bandas características 325 cm^{-1} (Se-Se), 604 cm^{-1} (C=S), 1554 cm^{-1} (amida) e 1656 cm^{-1} (C=C) nos espectros de Raman. A análise molecular permitiu confirmar a identificação dos isolados através da sequenciação de DNA, mas também agrupar estirpes por graus de similaridade e distinguir microrganismos metabolicamente mais ativos.

O conjunto de metodologias utilizadas neste trabalho permite um grau de complementaridade de resultados que poderá vir a ser bastante útil no contexto da biodeterioração / biodegradação do Património Cultural, possibilitando a caracterização da população microbiológica não-cultivável e distinguindo a presença de comunidades metabolicamente ativas e potencialmente biodeteriorogénicas.

Em conclusão, a abordagem polifásica providenciou informação muito proveitosa para a caracterização de comunidades fúngicas presentes em bens culturais e provou ser uma ferramenta útil para análises *in situ* ou *ex situ* da contaminação microbiológica dos bens patrimoniais.

Considerações Finais

De modo a complementar os estudos realizados neste trabalho, é proposta a adição de novas metodologias a esta abordagem polifásica, tais como:

- Utilização de sondas FISH, que podem permitir obter informação importante sobre a relação entre os microrganismos e a própria superfície dos materiais;
- Utilização de MALDI-TOF, que tem potencial para complementar a identificação fenotípica convencional para a maioria das estirpes de microrganismos isoladas;
- Utilização de outros marcadores moleculares, que poderão ser associados especificamente a certos microrganismos e, assim, funcionar como fator de distinção.

A informação obtida através desta abordagem polifásica contribuirá para a futura criação de uma base de dados que compile os diversos agentes microbiológicos que têm vindo a afetar o Património Cultural, de modo a permitir uma identificação e caracterização rápida e acessível a investigadores de várias áreas de estudo, e, assim possibilitar respostas expeditas e eficazes para promover a salvaguarda dos bens patrimoniais.

6. Referências Bibliográficas



Referências Bibliográficas

1. Michaelsen, A., Pinzari, F., Ripka, K., Lubitz, W., and Piñar, G., *Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2006. **58**(3-4): p. 133-141.
2. Michaelsen, A., Piñar, G., Montanari, M., and Pinzari, F., *Biodeterioration and restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: A case study*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(2): p. 161-168.
3. Michaelsen, A., Pinzari, F., Barbabietola, N., and Pinar, G., *Monitoring the effects of different conservation treatments on paper-infecting fungi*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **84**(100): p. 333-341.
4. Kumar, M. and Shukla, P.K., *Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rrna genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(2): p. 662-8.
5. Kumar, D. and Gupta, R.K., *Biocontrol of wood-rotting fungi*. Indian Journal of Biotechnology, 2006. **5**: p. 20-25.
6. González, J.M. and Saiz-Jiménez, C., *Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks*. International Microbiology, 2005. **8**: p. 189-194.
7. Gorbushina, A.A., Heyrman, J., Dornieden, T., Gonzalez-Delvalle, M., Krumbein, W.E., Laiz, L., Petersen, K., Saiz-Jimenez, C., and Swings, J., *Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreienzen, Germany)*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2004. **53**(1): p. 13-24.
8. Macedo, M.F., Miller, A.Z., Dionisio, A., and Saiz-Jimenez, C., *Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 11): p. 3476-90.
9. Sterflinger, K., *Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage*. Fungal Biology Reviews, 2010. **24**(1-2): p. 47-55.
10. Dakal, T.C. and Arora, P.K., *Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration*. Environmental Science and Biotechnology, 2012. **11**: p. 71-104.
11. Dornieden, T., Gorbushina, A.A., and Krumbein, W.E., *Biodecay of cultural heritage as a spacetime-related ecological situation*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000. **46**: p. 261-270.
12. Sterflinger, K. and Krumbein, W.E., *Precision replicas of microbially contaminated surfaces for optical and SEM-analyses*. Journal of Microbiological Methods, 1995. **23**: p. 301-308.
13. Herrera, L.K. and Videla, H.A., *Surface analysis and materials characterization for the study of biodeterioration and weathering effects on cultural property*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(7): p. 813-822.
14. Capodicasa, S., Fedi, S., Porcelli, A.M., and Zannoni, D., *The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010. **64**(8): p. 727-733.
15. Gu, J.-D., *Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003. **52**(2): p. 69-91.
16. Konsa, K., Tirrul, I., and Hermann, A., *Wooden objects in museums: Managing biodeterioration situation*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **86**: p. 165-170.

17. Caneva, G., Bartoli, F., Ceschin, S., Salvadori, O., Futagami, Y., and Salvati, L., *Exploring ecological relationships in the biodeterioration patterns of Angkor temples (Cambodia) along a forest canopy gradient*. Journal of Cultural Heritage, 2015. **16**(5): p. 728-735.
18. Guiamet, P., Crespo, M., Lavin, P., Ponce, B., Gaylarde, C., and de Saravia, S.G., *Biodeterioration of funeral sculptures in La Recoleta Cemetery, Buenos Aires, Argentina: pre- and post-intervention studies*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013. **101**: p. 337-42.
19. Korkanç, M. and Savran, A., *Impact of the surface roughness of stones used in historical buildings on biodeterioration*. Construction and Building Materials, 2015. **80**: p. 279-294.
20. Pietarinen, V.M., Rintala, H., Hyvarinen, A., Lignell, U., Karkkainen, P., and Nevalainen, A., *Quantitative PCR analysis of fungi and bacteria in building materials and comparison to culture-based analysis*. J Environ Monit, 2008. **10**(5): p. 655-63.
21. Cappitelli, F., Pasquariello, G., Tarsitani, G., and Sorlini, C., *Scripta manent? Assessing microbial risk to paper heritage*. Trends Microbiol, 2010. **18**(12): p. 538-42.
22. Kang, Y.-M., Prewitt, M.L., and Diehl, S.V., *Proteomics for biodeterioration of wood (Pinus taeda L.): Challenging analysis by 2-D PAGE and MALDI-TOF/TOF/MS*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(8): p. 1036-1044.
23. Anderson, I.C. and Parkin, P.I., *Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules*. J Microbiol Methods, 2007. **68**(2): p. 248-53.
24. Fazio, A.T., Cavicchioli, A., Penna, D.S.A., Chambergo, F.S., and Faria, D.L.A.d., *Towards a better comprehension of biodeterioration in earthen architecture: Study of fungi colonisation on historic wall surfaces in Brazil*. Journal of Cultural Heritage, 2015.
25. Rakotonirainy, M.S., Bénéaud, O., and Vilmont, L.-B., *Contribution to the characterization of foxing stains on printed books using infrared spectroscopy and scanning electron microscopy energy dispersive spectrometry*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015. **101**: p. 1-7.
26. Gorbushina, A.A. and Petersen, K., *Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000. **46**: p. 277-284.
27. Kemmling, A., Kämper, M., Flies, C., Schieweck, O., and Hoppert, M., *Biofilms and extracellular matrices on geomaterials*. Environmental Geology, 2004. **46**(3-4).
28. Warscheid, T. and Braamsb, J., *Biodeterioration of stone: a review*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000. **46**: p. 343-368.
29. Hu, H., Ding, S., Katayama, Y., Kusumi, A., Li, S.X., de Vries, R.P., Wang, J., Yu, X.-Z., and Gu, J.-D., *Occurrence of Aspergillus allahabadii on sandstone at Bayon temple, Angkor Thom, Cambodia*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **76**: p. 112-117.
30. Fang, H. and Xia, L., *Cellulase production by recombinant Trichoderma reesei and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues*. Fuel, 2015. **143**: p. 211-216.
31. Morrell-Falvey, J.L., Elkins, J.G., and Wang, Z.W., *Determination of the cellulase activity distribution in Clostridium thermocellum and Caldicellulosiruptor obsidiansis cultures using a fluorescent substrate*. J Environ Sci (China), 2015. **34**: p. 212-8.
32. Takeda, T., Nakano, Y., Takahashi, M., Konno, N., Sakamoto, Y., Arashida, R., Marukawa, Y., Yoshida, E., Ishikawa, T., and Suzuki, K., *Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from Euglena gracilis*. Phytochemistry, 2015. **116**: p. 21-7.
33. Xia, T.-T., Liu, C.-Z., Hu, J.-H., and Guo, C., *Improved performance of immobilized laccase on amine-functioned magnetic Fe₃O₄ nanoparticles modified with polyethylenimine*. Chemical Engineering Journal, 2016. **295**: p. 201-206.

Referências Bibliográficas

34. Xie, F., Chao, Y., Yang, X., Yang, J., Xue, Z., Luo, Y., and Qian, S., *Purification and characterization of four keratinases produced by Streptomyces sp. strain 16 in native human foot skin medium*. Bioresour Technol, 2010. **101**(1): p. 344-50.
35. Mazotto, A.M., Couri, S., Damaso, M.C.T., and Vermelho, A.B., *Degradation of feather waste by Aspergillus niger keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **85**: p. 189-195.
36. Sanghvi, G., Patel, H., Vaishnav, D., Oza, T., Dave, G., Kunjadia, P., and Sheth, N., *A novel alkaline keratinase from Bacillus subtilis DP1 with potential utility in cosmetic formulation*. Int J Biol Macromol, 2016. **87**: p. 256-62.
37. Zarai Jaouadi, N., Rekik, H., Ben Elhouli, M., Zohra Rahem, F., Hila, C.G., Ben Aicha, H.S., Badis, A., Toumi, A., Bejar, S., and Jaouadi, B., *A novel keratinase from Bacillus tequilensis strain Q7 with promising potential for the leather bating process*. Int J Biol Macromol, 2015. **79**: p. 952-64.
38. Syed, D.G., Lee, J.C., Li, W.J., Kim, C.J., and Agasar, D., *Production, characterization and application of keratinase from Streptomyces gulbargensis*. Bioresour Technol, 2009. **100**(5): p. 1868-71.
39. Herzog, B., Overy, D.P., Haltli, B., and Kerr, R.G., *Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments*. Syst Appl Microbiol, 2016. **39**(1): p. 49-57.
40. Rahayu, S., Syah, D., and Thenawidjaja Suhartono, M., *Degradation of keratin by keratinase and disulfide reductase from Bacillus sp. MTS of Indonesian origin*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2012. **1**(2): p. 152-158.
41. Chalupova, J., Raus, M., Sedlarova, M., and Sebel, M., *Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry*. Biotechnol Adv, 2014. **32**(1): p. 230-41.
42. Gaspar, P., Rocha, M., Kearns, A., Watkins, K., and Vilar, R., *A study of the effect of the wavelength in the Q-switched Nd:YAG laser cleaning of gilded wood*. Journal of Cultural Heritage, 2000. **1**: p. 133-144.
43. Blanchette, R.A., *A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000. **46**: p. 189-204.
44. Irbe, I., Karadelev, M., Andersone, I., and Andersons, B., *Biodeterioration of external wooden structures of the Latvian cultural heritage*. Journal of Cultural Heritage, 2012. **13**(3): p. S79-S84.
45. Pandey, K.K. and Pitman, A.J., *FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003. **52**(3): p. 151-160.
46. Guizzardi, M., Carmeliet, J., and Derome, D., *Risk analysis of biodeterioration of wooden beams embedded in internally insulated masonry walls*. Construction and Building Materials, 2015. **99**: p. 159-168.
47. Alonso, S.K.d., Silva, A.G.d., Kasuya, M.C.M., Barros, N.F.d., Cavallazzi, J.R.P., Bettucci, L., Lupo, S., and Alfenas, A.C., *Isolamento e Seleção de Fungos Causadores da Podridão Branca da Madeira em Florestas de Eucalyptus spp. Com Potencial de Degradação de Cepas e Raízes*. R. Árvore, 2006. **31**: p. 145-155.
48. Hamed, S.A.M., *In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: Aspergillus niger and Penicillium chrysogenum*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **78**: p. 98-102.
49. Hastrup, A.C.S., Green, F., Lebow, P.K., and Jensen, B., *Enzymatic oxalic acid regulation correlated with wood degradation in four brown-rot fungi*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012. **75**: p. 109-114.

Referências Bibliográficas

50. Fillat, Ú., Martín-Sampedro, R., Macaya-Sanz, D., Martín, J.A., Ibarra, D., Martínez, M.J., and Eugenio, M.E., *Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity*. Process Biochemistry, 2016. **51**(5): p. 589-598.
51. Saini, R., Saini, J.K., Adsul, M., Patel, A.K., Mathur, A., Tuli, D., and Singhania, R.R., *Enhanced cellulase production by Penicillium oxalicum for bio-ethanol application*. Bioresour Technol, 2015. **188**: p. 240-6.
52. Bartoli, F., Municchia, A.C., Futagami, Y., Kashiwadani, H., Moon, K.H., and Caneva, G., *Biological colonization patterns on the ruins of Angkor temples (Cambodia) in the biodeterioration vs bioprotection debate*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **96**: p. 157-165.
53. Giannantonio, D.J., Kurth, J.C., Kurtis, K.E., and Sobecky, P.A., *Molecular characterizations of microbial communities fouling painted and unpainted concrete structures*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(1): p. 30-40.
54. Gadd, G.M., Bahri-Esfahani, J., Li, Q., Rhee, Y.J., Wei, Z., Fomina, M., and Liang, X., *Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation*. Fungal Biology Reviews, 2014. **28**: p. 36-55.
55. Calicchia, P. and Cannelli, G.B., *Detecting and mapping detachments in mural paintings by non-invasive acoustic technique: measurements in antique sites in Rome and Florence*. Journal of Cultural Heritage, 2005. **6**(2): p. 115-124.
56. Rosado, T., Martins, M.d.R., Pires, M., Mirao, J., Candeias, A., and Caldeira, A.T., *Enzymatic Monitorization Of Mural Paintings Biodegradation And Biodeterioration*. International Journal Of Conservation Science, 2013. **4**: p. 603-612.
57. Nugari, M.P., Pietrini, A.M., Caneva, G., Imperi, F., and Visca, P., *Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy)*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(6): p. 705-711.
58. Rosado, T., Gil, M., Caldeira, A.T., Martins, M.d.R., Dias, C.B., Carvalho, L., Mirão, J., and Candeias, A.E., *Material Characterization and Biodegradation Assessment of Mural Paintings: Renaissance Frescoes from Santo Aleixo Church, Southern Portugal*. International Journal of Architectural Heritage, 2014. **8**(6): p. 835-852.
59. Kiyuna, T., Kigawa, R., Sugiyama, J., An, K.-D., Sano, C., and Miura, S., *Molecular assessment of fungi in "black spots" that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan: Acremonium sect. Gliomastix including Acremonium tumulicola sp. nov. and Acremonium felinum comb. nov.* Mycoscience, 2011. **52**: p. 1-17.
60. Kraková, L., Chovanová, K., Selim, S.A., Šimonovičová, A., Puškarová, A., Maková, A., and Pangallo, D., *A multiphasic approach for investigation of the microbial diversity and its biodegradative abilities in historical paper and parchment documents*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012. **70**: p. 117-125.
61. Zotti, M., Ferroni, A., and Calvini, P., *Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008. **62**(2): p. 186-194.
62. Florian, M.-L.E. and Manning, L., *SEM analysis of irregular fungal fox spots in an 1854 book: population dynamics and species identification*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000. **46**: p. 205-220.
63. Rozalen, M. and Ruiz Gutierrez, A., *A study of the origin and gilding technique of a Hispano-Philippine ivory from the XVIIth century*. Journal of Archaeological Science: Reports, 2015. **4**: p. 1-7.
64. Amann, R., Fuchs, B.M., and Behrens, S., *The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation*. Environmental biotechnology, 2001. **12**: p. 231-236.
65. Das, S., Dash, H.R., Mangwani, N., Chakraborty, J., and Kumari, S., *Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness*

- and phylogenetic relationships of microorganisms*. J Microbiol Methods, 2014. **103**: p. 80-100.
66. Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., and Schubert, S., *MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review)*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. **93**(3): p. 965-974.
67. Kennedy, N. and Clipson, N., *Fingerprinting the fungal community*. Mycologist, 2003. **17**: p. 158-164.
68. Ettenauer, J., Pinar, G., Tafer, H., and Sterflinger, K., *Quantification of fungal abundance on cultural heritage using real time PCR targeting the beta-actin gene*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 262.
69. Saad, D.S., Kinsey, G.C., Kim, S., and Gaylarde, C.C., *Extraction of genomic DNA from filamentous fungi in biofilms on water-based paint coatings*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2004. **54**(2-3): p. 99-103.
70. Einax, E. and Voigt, K., *Oligonucleotide primers for the universal amplification of -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi*. Organisms Diversity and Evolution, 2003. **3**: p. 185-194.
71. An, H.R., Mainelis, G., and White, L., *Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples*. Atmospheric Environment, 2006. **40**(40): p. 7924-7939.
72. Zhang, T. and Fang, H.H., *Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **70**(3): p. 281-9.
73. Penna, A. and Galluzzi, L., *The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species*. Environ Sci Pollut Res Int, 2013. **20**(10): p. 6851-62.
74. Galluzzi, L., Penna, A., Bertozzini, E., Vila, M., Garcés, E., and Magnani, M., *Development of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection and Quantification of Alexandrium minutum (a Dinoflagellate)*. Applied And Environmental Microbiology, 2004. **70**(2): p. 1199-1206.
75. Stockel, S., Schumacher, W., Meisel, S., Elschner, M., Rosch, P., and Popp, J., *Raman Spectroscopy-Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. **76**(9): p. 2895-2907.
76. Ashton, L., Lau, K., Winder, C.L., and Goodacre, R., *Raman Spectroscopy - Lighting Up the Future of Microbial Identification*. Future Microbiolgy, 2011. **6**(9): p. 991-997.
77. Ngo-Thi, N.A., Kirschner, C., and Naumann, D., *Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry*. Journal of Molecular Structure, 2003. **661-662**: p. 371-380.
78. Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., and Dott, W., *FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi*. Journal of Microbiological Methods, 2006. **64**: p. 63- 77.
79. Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S.T., and Nelson, E.B., *Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities*. Applied Soil Ecology, 2000. **15**: p. 25-36.
80. Biswas, S. and Rolain, J.M., *Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture*. J Microbiol Methods, 2013. **92**(1): p. 14-24.
81. De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., and Vandamme, P., *Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning*. Syst Appl Microbiol, 2011. **34**(1): p. 20-9.
82. Buskirk, A.D., Hettick, J.M., Chipinda, I., Law, B.F., Siegel, P.D., Slaven, J.E., Green, B.J., and Beezhold, D.H., *Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser*

Referências Bibliográficas

- desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi*. Anal Biochem, 2011. **411**(1): p. 122-8.
83. Carolis, E.D., Posteraro, B., Lass-Flörl, C., Vella, A., Florio, A.R., Torelli, R., Girmenia, C., Colozza, C., Tortorano, A.M., Sanguinetti, M., and Fadda, G., *Species identification of Aspergillus, Fusarium and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clinical Microbiology and Infection, 2011. **18**: p. 475-484.
84. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T., *Molecular cloning: A laboratory manual*. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
85. Pitcher, D.G., Saunders, N.A., and Owen, R.J., *Rapid extraction of genomic DNA with guanidinium thiocyanate*. Letters in Applied Microbiology, 1989. **8**(4): p. 151 - 156.
86. Rinta-Kanto, J.M., Ouellette, A.J.A., Boyer, G.L., Twiss, M.R., Bridgeman, T.B., and Wilhelm, S.W., *Quantification of Toxic Microcystis spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**: p. 4198-4205.
87. Coton, M., Denis, C., Cadot, P., and Coton, E., *Biodiversity and characterization of aerobic spore-forming bacteria in surimi seafood products*. Food Microbiol, 2011. **28**(2): p. 252-60.
88. Mongkolsamrit, S., Luangsa-Ard, J.J., Spatafora, J.W., Sung, G.H., and Hywel-Jones, N.L., *A combined ITS rDNA and beta-tubulin phylogeny of Thai species of Hypocrella with non-fragmenting ascospores*. Mycol Res, 2009. **113**(Pt 6-7): p. 684-99.
89. Gil, M., Rosado, T., Ribeiro, I., Pestana, J.A., Caldeira, A.T., Carvalho, M.L., Dias, L., Mirão, J., and Candeias, A., *Are they frescopaintings? Technical and material study of Casas Pintadas of Vasco da Gama house in Évora (Southern Portugal)*. X-Ray Spectrometry, 2015. **44**(3): p. 154-162.
90. Rosado, T., Gil, M., Mirão, J., Candeias, A., and Caldeira, A.T., *Darkening on lead-based pigments: Microbiological contribution*. Color Research & Application, 2016. **41**(3): p. 294-298.
91. Rosado, T., Mirao, J., Candeias, A., and Caldeira, A.T., *Microbial communities analysis assessed by pyrosequencing--a new approach applied to conservation state studies of mural paintings*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(3): p. 887-95.
92. Rosado, T., Gil, M., Mirão, J., Candeias, A., and Caldeira, A.T., *Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms – A comprehensive study*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **85**: p. 1-7.
93. Rosado, T., Reis, A., Mirão, J., Candeias, A., Vandenabeele, P., and Caldeira, A.T., *Pink! Why not? On the unusual colour of Évora Cathedral*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **94**: p. 121-127.
94. Rosado, T., Silva, M., Pereira, C., Mirão, J., Candeias, A., and Caldeira, A.T., *Gilded Woodcarving Alteration: Assessment Of Filamentous Fungi Action*. International Journal Of Conservation Science, 2015. **6**: p. 499-506.
95. Manso, M., Cardeira, A.M., Silva, M., Le Gac, A., Pessanha, S., Guerra, M., Caldeira, A.T., Candeias, A., and Carvalho, M.L., *The mysterious halos in iron gall ink manuscripts: an analytical explanation*. Applied Physics A, 2014. **118**(3): p. 1107-1111.

7. Anexos



A. Materiais

- Algodão cardado;
- Ansa;
- Balões volumétricos;
- Bisturi e lâminas;
- Erlenmeyers;
- Espátulas;
- Gobelés;
- Luvas;
- Micropipetas P5000, P1000, P200, P100, P10 (e respectivas pontas, novas e estéreis);
- Microtubos de 2, 1,5 e 0,2 mL novos e estéreis;
- Parafilme;
- Pinças;
- Pipetas de Pasteur;
- Placas de Petri;
- Provetas volumétricas;
- Suporte para tubos de ensaio e microtubos;
- Tubos de ensaio;
- Zangatos.

B. Equipamentos

- Autoclave Uniclave 88;
- Balança analítica Ohaus Instrument Company;
- Banho termostático Grant / Memmert;
- Bico de Büsen;
- Centrifugadora HERMLE Z252MK;
- Espectrofotômetro Hitachi U-3010;
- Estufa VWR dry-line;
- Geladeira Philips;
- Lupa binocular Leica M205C com câmara Leica DFC290HD;
- Microscópio óptico Leica DM 2500P com câmara Leica DFC290HD;
- Placa de aquecimento Labinco L34;
- Vórtex Zx3 UniEquip.

C. Composição dos meios de cultura

Meio de Malte Extrato Agar - MEA (*Malt Extract Agar*)

Dissolver 20 g de extrato de malte, 1 g de peptona, 20 g de glucose e 20 g de agar em 1000 mL de água destilada.

Meio PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Dissolver 39 g de PDA em 1000 mL de água destilada. Esterilizar na autoclave a 121°C.

D. Soluções para extração de DNA de fungos filamentosos

Tampão de lise:

Tris-HCl - 50mM; NaCl - 250 mM; EDTA - 50 mM; SDS – 0.3%; pH 8

Dissolver 0,3030 g de Tris-HCl, 0,7305 g de NaCl e 0,9305 g de EDTA em 40 mL de água ultra-pura e acertar a pH 8. Depois, transferir para um balão e perfazer o volume a 50 mL com água ultra-pura. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 min, deixar arrefecer e adicionar 0,1500 g de SDS. Guardar à temperatura ambiente.

Tampão de extração – TE:

Tris – 10mM; EDTA – 1mM; pH 8

Dissolver 0,3029 g de Tris e 0,0931 g de EDTA em 200 mL de água ultra-pura e acertar a pH 8. Depois, transferir para um balão e perfazer volume a 250 mL com água ultra-pura. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15min e guardar à temperatura ambiente.

Tampão acetato de sódio - 3M, pH 5,2:

Dissolver 24,61 g de acetato de sódio em 70 mL de água ultra-pura e acertar a pH 5,2 com ácido acético glacial. Deixar arrefecer e perfazer o volume para 100 mL com água ultra-pura. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15min e guardar à temperatura ambiente.

Solução de TE com RNase (50 µg.mL⁻¹)

Pipetar 50 µL de solução *stock* de RNase de 10mg.mL⁻¹ para um balão estéril e perfazer até volume de 10 mL com TE. Separar em alíquotas de 1 mL em microtubos estéreis e conservar a -20°C.

E. Gel de agarose 1%

Adicionaram-se 0,65 g de agarose a 65 mL de TBE 0,5x e aqueceu-se até a agarose estar totalmente dissolvida. Depois de arrefecer, adicionaram-se 6,5 µL de SYBR green (corante de DNA), agitou-se ligeiramente e colocou-se no suporte para géis com o pente adequado – o gel demora aproximadamente 20 min para solidificar.

F. Análise elementar por MEV-EDS

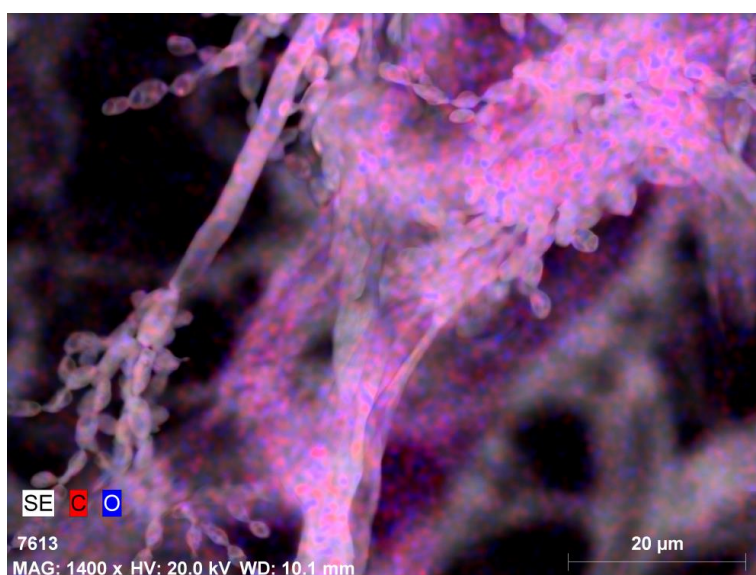


Figura 45 - Imagem de MEV-EDS, onde é possível observar a composição elementar do isolado fúngico, cujos constituintes identificados são carbono e oxigénio.

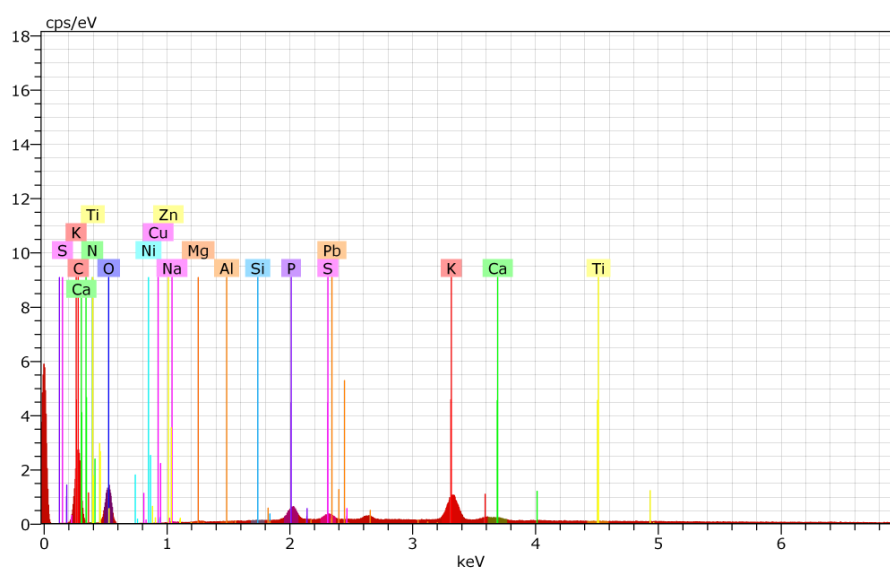


Figura 46 – Espectro de EDS com a composição elementar de um isolado fúngico.

Anexos

G. Resumo das características dos isolados fúngicos observadas macroscopicamente

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura.

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
Z1LA	CYA	Branco	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Branco	Crema	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Branco	Branco	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Branco	Crema	Sem pigmentação
Z1LB	CYA	Cor-de-rosa	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Cor-de-rosa	Cor-de-rosa	Sem pigmentação
	PDA	Cor-de-rosa	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Cor-de-rosa	Cor-de-rosa	Sem pigmentação
	MEA	Cor-de-rosa	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Cor-de-rosa	Cor-de-rosa	Sem pigmentação
Z4F2	CYA	Verde azeitona, rebordo verde-escuro	Altura média, denso, aveludado, rebordo recortado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado, rebordo verde-escuro	Profundo, sulcado, denso	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde azeitona, rebordo verde-escuro	Altura média, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
Z4F4	CYA	Preto	Altura média, denso, mas disperso no rebordo, flocoso	Branco	Preto	Branco com o centro preto	Sem pigmentação
	PDA	Preto com o centro branco	Altura média, denso, flocoso	Branco	Preto	Branco com o centro cinzento-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Preto	Altura média, denso, flocoso	Branco	Preto	Creme com o centro mais escuro	Sem pigmentação
P1A3F1	CYA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Verde azeitona e creme alternados	Sem pigmentação
	PDA	Verde azeitona com rebordo branco	Altura média, denso, flocoso	Sem exsudado	Branco	Creme escuro com rebordo branco	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme, com o centro mais escuro	Sem pigmentação
P1A4F1	CYA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Verde azeitona e creme alternados	Sem pigmentação
	PDA	Branco com rebordo amarelo escuro	Altura média, denso, aveludado com rebordo gelatinoso	Sem exsudado	Branco	Amarelo escuro com rebordo branco	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Verde seco com rebordos creme	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
P3A4F1	CYA	Verde seco	Plano, denso no centro, pó	Sem exsudado	Verde seco	Verde seco	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde seco	Vermelho	Vermelho
	MEA	Branco	Plano, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme com rebordos vermelhos	Vermelho
P5F2	CYA	Verde seco	Plano, disperso, pó	Sem exsudado	Verde seco	Verde seco	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Plano, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Vermelho	Vermelho
	MEA	Branco	Plano, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme	Vermelho
Z6-F2	CYA	Verde azeitona	Sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde azeitona	Sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde azeitona	Sulcado no centro, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
Z9-F1	CYA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Creme escuro	Cor-de-laranja escuro
	PDA	Verde acinzentado com rebordos brancos	Plano, denso, flocoso, pó	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Amarelo	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Amarelo-escuro	Amarelo escuro
Z11-F2	CYA	Verde acinzentado	Sulcado no centro, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Creme escuro	Creme escuro
	PDA	Verde acinzentado com rebordos brancos	Plano, denso, flocoso, pó	Exsudado incolor	Verde acinzentado/cinzentado	Branco	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Creme	Sem pigmentação
Z14-F1	CYA	Verde acinzentado	Sulcado no centro, denso, pó	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Creme escuro	Creme escuro
	PDA	Verde acinzentado com rebordos brancos	Plano, denso, flocoso, pó	Exsudado incolor	Cinzentado	Branco	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado com rebordos brancos	Plano, denso, flocoso, pó	Exsudado incolor	Cinzentado	Creme	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
Z15-F1b	CYA	Branco/Creme	Plano, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco/Creme	Cor-de-laranja escuro	Sem pigmentação
	PDA	Creme	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Creme	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco com centro amarelo	Sulcado, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco/A marelo	Creme escuro	Sem pigmentação
SA-3C	CYA	Branco	Altura média, densidade baixa, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Branco	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura média, densidade média, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura média, densidade média, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme	Sem pigmentação
SA-3F	CYA	Branco	Plano, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura média, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura média, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
SA-5B	CYA	Verde azeitona com rebordos mais claros	Sulcado, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde azeitona	Plano, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde azeitona com centro verde acinzentado	Plano mas sulcado no centro, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
SA-5E	CYA	Verde azeitona, com rebordos mais escuros	Altura média, sulcado, denso, flocoso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde azeitona, com rebordos mais escuros	Plano, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde azeitona, com rebordos mais escuros	Altura média, sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
CPIL1	CYA	Cor-de-rosa	Plano, sulcado, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Cor-de-rosa	Cor-de-rosa	Sem pigmentação
	PDA	Cor-de-rosa	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Cor-de-rosa	Cor-de-rosa	Sem pigmentação
	MEA	Cor-de-rosa	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Cor-de-rosa	Cor-de-rosa	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
CRIF2	CYA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Branco com centro preto	Sem pigmentação
	PDA	Branco com centro cor-de-rosa	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Branco com centro cor-de-rosa escuro	Sem pigmentação
	MEA	Branco com centro cor-de-rosa	Altura média, denso, aveludado	Exsudado amarelo alaranjado	Branco	Branco com centro preto	Sem pigmentação
NEF11	CYA	Verde azeitona	Altura média, sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde azeitona	Sem pigmentação
	PDA	Verde azeitona, com rebordos brancos	Altura média, sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde azeitona com rebordos brancos	Sem pigmentação
	MEA	Verde azeitona, com rebordos brancos	Altura média, sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde azeitona com rebordos brancos	Sem pigmentação
NEF27	CYA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Crema	Amarelo
	PDA	Verde acinzentado, com rebordos brancos	Plano, denso, pó	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Branco	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Plano, denso, flocoso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Crema	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
NEF29	CYA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Branco com centro creme	Sem pigmentação
	PDA	Branco e cor-de-laranja	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Amarelo, com centro cor-de-laranja	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Amarelo, com centro cor-de-rosa escuro	Sem pigmentação
SEF7	CYA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Amarelo, com centro cor-de-rosa	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura média, denso, flocoso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco, com centro cor-de-rosa	Altura média, denso, aveludado	Exsudado cor-de-rosa	Branco	Creme amarelado	Sem pigmentação
SEF21	CYA	Creme	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Creme	Creme	Sem pigmentação
	PDA	Preto, com rebordos brancos	Plano, sulcado, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Preto	Cinzeno, com rebordos brancos	Sem pigmentação
	MEA	Preto	Plano, sulcado, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Preto	Cinzeno	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
P2-1	CYA	Verde azeitona	Altura média, sulcado, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde azeitona	Altura média, sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde azeitona e cinzento	Altura média, sulcado, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
P2-2A	CYA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme escuro	Sem pigmentação
P2-3	CYA	Amarelo, com rebordos mais claros	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Amarelo	Creme escuro	Sem pigmentação
	PDA	Amarelo, com rebordos mais claros	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Amarelo	Creme escuro	Sem pigmentação
	MEA	Amarelo, com rebordos mais claros	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Amarelo	Creme escuro	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
P4-5 verde	CYA	Verde acinzentado com rebordos verde azeitona	Plano, sulcado, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado com rebordos verde azeitona	Plano, sulcado, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado com rebordos verde azeitona	Plano, sulcado, denso, pó	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
P5-2A Ad. Org. A	CYA	Creme, com rebordos pretos	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Preto	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado e branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Verde-escuro com centro creme	Sem pigmentação
	MEA	Cinzeno, com rebordos pretos	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Preto, com rebordos mais claros	Sem pigmentação
P5-2A Ad. Org. B	CYA	Cinzeno	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Cinzeno	Creme, com centro preto	Sem pigmentação
	PDA	Cinzeno	Altura média, denso, pó	Sem exsudado	Cinzeno	Castanho	Sem pigmentação
	MEA	Cinzeno, com centro mais escuro	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Cinzeno	Castanho, com rebordos creme	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
P5-3 Preto A	CYA	Cinzento	Altura média, flocoso, sulcado, denso, aveludado	Exsudado incolor	Cinzento	Creme escuro, com centro creme	Sem pigmentação
	PDA	Cinzento	Altura média, flocoso, sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Cinzento	Creme, com centro creme escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Altura média, flocoso, sulcado, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Creme avermelhado	Vermelho
Altar 2-Coluna B	CYA	Creme	Plano, denso, aveludado	Sem exsudado	Creme	Creme escuro	Sem pigmentação
	PDA	Cinzento	Plano, sulcado, denso, aveludado	Sem exsudado	Cinzento	Cinzento	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Plano, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde acinzentado	Creme	Sem pigmentação
Altar 2-Coluna C	CYA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Castanho	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme, com centro mais escuro	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
Altar 2-Coluna F	CYA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Castanho, com centro mais escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Amarelo	Amarelo
	MEA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Cor de laranja escuro	Amarelo
Altar 2-D	CYA	Verde azeitona	Plano, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Plano, denso, pó	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
Altar 2-E	CYA	Creme	Altura média, denso, sulcado, aveludado	Sem exsudado	Creme	Creme, com centro amarelo	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura média, denso, sulcado, aveludado	Exsudado incolor	Creme	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Creme	Altura média, denso, sulcado, aveludado	Exsudado incolor	Creme	Creme	Amarelo

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
Altar 2-I	CYA	Verde azeitona	Plano, denso, sulcado, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado	Plano, denso, aveludado	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Plano, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
Altar 2-K	CYA	Verde azeitona com centro amarelado	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde azeitona	Amarelo	Sem pigmentação
	PDA	Verde azeitona	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde azeitona	Crema	Sem pigmentação
	MEA	Verde azeitona	Plano, denso, pó	Sem exsudado	Verde azeitona	Crema	Sem pigmentação
FA5a	CYA	Verde azeitona	Plano, denso, sulcado, pó	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado	Plano, denso, sulcado, pó	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Plano, denso, sulcado, pó	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
FA5b	CYA	Branco	Altura média, densidade média, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Branco	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Branco, com centro creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura média, denso, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Branco, com centro creme	Sem pigmentação
FA6a	CYA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme escuro	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Sem exsudado	Branco	Amarelo	Sem pigmentação
Fa6b	CYA	Verde acinzentado	Altura média, denso, sulcado, aveludado	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro, com rebordos brancos	Amarela
	PDA	Verde acinzentado	Altura média, denso, sulcado, aveludado	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Verde-escuro, com rebordos brancos	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado	Altura elevada, denso, sulcado, aveludado	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro, com rebordos brancos	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
FA6c	CYA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme escuro	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme	Sem pigmentação
FA7a	CYA	Branco	Altura elevada, densidade baixa, aveludado	Sem exsudado	Branco	Branco	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura elevada, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura elevada, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação
FA7b	CYA	Verde azeitona	Plano, denso, sulcado, aveludado	Exsudado incolor	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde azeitona	Altura média, denso, sulcado, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde azeitona	Altura elevada, denso, sulcado, aveludado	Sem exsudado	Verde azeitona	Verde-escuro	Sem pigmentação

Anexos

Tabela 15 - Características dos isolados fúngicos nos diferentes meios de cultura. (continuação)

	Meio	Cor do micélio	Aspetto do micélio	Exsudado	Cor dos conídios	Coloração do verso	Pigmentação do meio de cultura
IL9c	CYA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme escuro	Sem pigmentação
	PDA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Altura elevada, densidade média, aveludado	Exsudado incolor	Branco	Creme	Sem pigmentação
IL10b	CYA	Verde acinzentado	Plano, denso, aveludado	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Creme, com centro mais escuro	Sem pigmentação
	PDA	Verde acinzentado	Altura média, denso, sulcado, aveludado	Sem exsudado	Verde acinzentado	Verde-escuro	Sem pigmentação
	MEA	Verde acinzentado, com rebordo brancos	Altura média, denso, sulcado, aveludado	Exsudado incolor	Verde acinzentado	Verde-escuro, com rebordos brancos	Sem pigmentação
IL12a	CYA	Creme	Plano, densidade média, gelatinoso	Sem exsudado	Creme	Creme	Sem pigmentação
	PDA	Creme	Plano, denso, gelatinoso	Sem exsudado	Creme	Creme, com centro escuro	Sem pigmentação
	MEA	Branco	Plano, denso, aveludado	Sem exsudado	Branco	Creme	Sem pigmentação

H. Quantificação de DNA

Tabela 16 - Quantificação do DNA dos isolados fúngicos.

Isolado fúngico	Concentração de DNA (µg/mL)
FA5a	388,7745
FA5b	451,8137
FA6a	420,8333
FA6b	447,1078
FA7a	399,5588
FA7b	360,1961
IL10b	362,2059
IL12a	443,4314
Z15-F1b	404,6569
Z6-F2	466,7647
Z9-F1	403,6765
Z14-F1	417,5490
CRIF2	429,8529
NEF11	407,7941
NEF27	478,2843
NEF29	467,9412
SEF7	429,4608
SEF21	430,5882
P3A4F1	404,8039
P5F2	382,9412
P1A4F1	406,5686
Altar 2 - coluna B	468,4314
Altar 2 - D	475,8333
Altar 2 - I	436,2745
Z1LA	412,0588
Z1LB	424,8039
Z4F2	379,2157
SA-3C	430,2941
SA-3F	489,0196
SA-5B	441,4216
SA-5E	486,0294
P2-1	419,7549
P2-2-A	423,9706
P2-3	411,8627
P4-5 verde	490,1961
P5-2A A. O. A	449,4608
P5-2A A. O. B	523,4314
P5-3 Preto A	473,6765